

# **Funktionelle Aspekte von P-Cadherin**

## **bei der Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms**



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für  
Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Karin Bauer  
Regensburg, 2012

# **Funktionelle Aspekte von P-Cadherin**

## **bei der Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms**

### **Teil I**

**P-Cadherin induziert in einer oralen, mesenchymalen Plattenepithelkarzinomzelllinie einen Epithel-ähnlichen Phänotyp**

### **Teil II**

**P-Cadherin reguliert in Verbindung mit dem Slit/Robo-Signalweg die Migration einer oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie**

### **Teil III**

**P-Cadherin reguliert in gesunden, primären, oralen Keratinozyten die Keratin-1- und Keratin-10-Expression**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für  
Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Karin Bauer  
Regensburg, 2012

Promotionsgesuch eingereicht im September 2012

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Dr. Richard Bauer.

Vorsitzender: Prof. Dr. Wirth

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Reichert

2. Gutachter: Prof. Dr. Tamm

3. Prüfer: Prof. Dr. Wagner

# Inhaltsverzeichnis

<i>Funktionelle Aspekte von P-Cadherin</i> .....	1
<i>bei der Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms</i> .....	1
<i>Funktionelle Aspekte von P-Cadherin</i> .....	2
<i>bei der Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms</i> .....	2
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2 Einleitung</b> .....	3
<b>2.1 Das orale Epithel</b> .....	3
2.1.1 Aufbau und Funktion des oralen Epithels .....	3
2.1.2 Aufbau und Funktion der Keratine .....	4
2.1.3 Differenzierung der Keratinozyten .....	5
<b>2.2 Das orale Plattenepithelkarzinom</b> .....	6
2.2.1 Epidemiologie.....	6
2.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren .....	6
2.2.3 Tumorgenese .....	7
<b>2.3 Cadherine</b> .....	9
2.3.1 Aufbau und Funktion der Cadherine.....	9
2.3.2 Aufbau und Funktion von P-Cadherin .....	12
<b>2.4 Der Wnt/beta-Catenin-Signalweg</b> .....	13
<b>2.5 Die epithelial-mesenchymale Transition</b> .....	14
<b>2.6 Der Slit/Robo-Signalweg</b> .....	16
2.6.1 Aufbau und Funktion der Slit- und Robo-Proteine.....	16
2.6.2 Die Rolle des Slit/Robo-Signalwegs außerhalb des Nervensystems.....	18
2.6.3 Die Rolle von Slit-2 im Tumor .....	19
<b>3 Material und Methoden</b> .....	21
<b>3.1 Zellkulturmethoden</b> .....	21
3.1.1 Isolierung primärer, oraler Keratinozyten aus gesundem, mukosalem bzw. OSCC-Gewebe .....	21
3.1.2 Kultivierung der Zelllinien .....	21
3.1.3 Transfektion .....	22
3.1.3.1 Stabile Transfektion.....	22
3.1.3.2 Transiente Transfektion.....	23
3.1.4 Migrationsexperimente.....	24
3.1.5 Inhibierung von GSK3-beta .....	25
3.1.5.1 Inhibierung von GSK3-beta mit Hilfe des Inhibitors BIO .....	25
3.1.5.2 Inhibierung von GSK3-beta mit Hilfe von Lithiumchlorid .....	25
3.1.6 Inhibierung des beta-Catenin/Lef/Tcf-Komplexes .....	25
3.1.7 C/EBP-beta Luciferase Reporter Gen Assay .....	25
3.1.8 Durchflusszytometrische Analyse .....	26
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	26
3.2.1 Klonierung .....	26
3.2.2 RNA-Isolierung .....	27
3.2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen.....	27
3.2.2.2 RNA-Isolierung aus Gewebe .....	27
3.2.3 Reverse Transkription .....	28
3.2.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion .....	28
3.2.4.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit SybrGreen .....	28

3.2.4.2	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit TaqMan-Sonden .....	29
3.2.5	Humaner Stammzell-Array .....	31
3.2.6	Isolierung genomischer DNA, Bisulfit-Modifikation und Analyse des E-Cadherin-Promotors mit Hilfe von methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion .....	32
<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Proteingewinnung aus Zellen .....	33
3.3.2	Proteinquantifizierung .....	34
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	34
3.3.4	Western Blot .....	35
3.3.5	Proteindetektion auf Western Blots .....	35
3.3.6	Immunpräzipitation.....	35
3.3.6.1	Immunpräzipitation mit magnetischen Microbeads .....	35
3.3.6.2	Immunpräzipitation mit Sepharose Protein A Beads .....	36
3.3.7	Protein-Dephosphorylierung mit <i>Lambda</i> -Proteinphosphatase .....	36
3.3.8	Gewebeschnitte .....	36
3.3.9	Immunhistochemie .....	37
3.3.10	Immunzytochemie.....	37
3.3.11	Immunfluoreszenz.....	37
3.3.12	Proximity Ligation Assay .....	38
3.3.13	Enzyme Linked Immunosorbent Assay.....	39
3.3.14	Mikroskop.....	39
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>Teil I .....</b>	<b>41</b>	
<b>4.1</b>	<b>Die Rolle von P-Cadherin in der OSCC-Zelllinie PCI52.....</b>	<b>41</b>
4.1.1	Expression von P-Cadherin in der oralen Mukosa und im OSCC.....	41
4.1.2	Expression von P-Cadherin in der OSCC-Zelllinie PCI52 .....	42
4.1.3	Einfluss von P-Cadherin auf die Zellmorphologie.....	43
4.1.4	Einfluss von P-Cadherin auf EMT-Marker sowie auf die Zellmigration .....	44
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle von Snail in der OSCC-Zelllinie PCI52 .....</b>	<b>46</b>
4.2.1	Expression von Snail im OSCC sowie in der OSCC-Zelllinie PCI52.....	46
4.2.2	Einfluss des P-Cadherin- bzw. Snail-Knockdowns auf die Zellmorphologie sowie auf die Snail-Lokalisation.....	47
4.2.3	Einfluss von Snail auf die E-Cadherin-Expression .....	48
4.2.4	Untersuchung des E-Cadherin-Promotors .....	49
<b>4.3</b>	<b>Die Rolle von GSK3-beta in der OSCC-Zelllinie PCI52.....</b>	<b>50</b>
4.3.1	Nachweis der GSK3-beta/Snail-Interaktion.....	50
4.3.2	Einfluss der GSK3-beta-Aktivität auf die Snail-Phosphorylierung .....	51
<b>4.4</b>	<b>Zusammenfassung Teil I .....</b>	<b>52</b>
<b>Teil II .....</b>	<b>53</b>	
<b>4.5</b>	<b>Die Rolle von Slit-2 in der OSCC-Zelllinie PCI52 .....</b>	<b>53</b>
4.5.1	Expression von Slit-2 in der oralen Mukosa und im OSCC .....	53
4.5.2	Expression von Slit-2 in der OSCC-Zelllinie PCI52.....	55
4.5.3	Einfluss von P-Cadherin auf die Slit-2-Sekretion .....	56
4.5.4	Einfluss von Slit-2 auf den Wnt-Signalweg .....	57
4.5.5	Einfluss von Slit-2 auf die Zellmigration .....	58
<b>4.6</b>	<b>Die Rolle von Robo-3 in der OSCC-Zelllinie PCI52.....</b>	<b>59</b>
4.6.1	Expression von Robo-3 in der oralen Mukosa.....	59
4.6.2	Nachweis der P-Cadherin/Robo-3-Interaktion.....	59
4.6.3	Einfluss des Robo-3-Knockdowns auf die Zellmigration.....	61
4.6.4	Nachweis der Robo-3/Abl-Interaktion .....	62

<b>4.7</b>	<b>Zusammenfassung Teil II .....</b>	<b>63</b>
	<b>Teil III .....</b>	<b>64</b>
<b>4.8</b>	<b>Die Rolle von P-Cadherin bei der Keratin-Expression .....</b>	<b>64</b>
4.8.1	Einfluss von P-Cadherin auf die Keratin-1- und Keratin-10-Expression .....	64
4.8.2	Einfluss von E-Cadherin auf die Keratin-1- und Keratin-10-Expression .....	67
4.8.3	Einfluss von P-Cadherin auf die Keratin-5- und Keratin-14-Expression .....	69
4.8.4	Einfluss von GSK3-beta auf die Keratin-1- und Keratin-10-Expression .....	70
4.8.5	Einfluss von P-Cadherin auf die Expression und Lokalisation von C/EBP-beta .....	71
<b>4.9</b>	<b>Der Einfluss von P-Cadherin auf die Proliferation von Keratinozyten .....</b>	<b>73</b>
<b>4.10</b>	<b>Zusammenfassung Teil III .....</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
5.1	P-Cadherin und der GSK3-beta/Snail-Signalweg .....	78
5.2	P-Cadherin und der Slit/Robo-Signalweg .....	82
5.3	P-Cadherin und die Regulation der Keratin-1- und Keratin-10-Expression .....	87
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>101</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	101
	Antikörperliste .....	103
	Danksagung .....	105
	Erklärung .....	106

# 1 Zusammenfassung

Die Auflösung der epithelialen Architektur durch Reduzierung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen gehört zu den ersten Schritten der Metastasierung von Karzinomzellen. Der Verlust von Zelladhäsionsmolekülen –Cadherine sind einige davon– trägt entscheidend zum Loslösen der Karzinomzellen aus dem Tumorverband bei. So ermöglicht im oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC) der Verlust der Adhäsionsfunktion von P-Cadherin das Auswandern dieser Karzinomzellen.

Um Einblicke in die Funktion dieses Adhäsionsproteins zu erhalten, sollten daher im Rahmen dieser Dissertation die funktionellen Aspekte von P-Cadherin bei der Progression des OSCC sowie bei der Differenzierung gesunder, oraler Keratinozyten untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde in einer oralen, Cadherin-defizienten Plattenepithelkarzinomzelllinie die Reversion der epithelial-mesenchymalen Transition, induziert durch P-Cadherin-Expression, analysiert. Die Re-Expression von P-Cadherin war imstande, die Migration dieser OSCC-Zellen zu reduzieren sowie die Translokation des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors beta-Catenin an die Zellmembran zu initiieren. Desweiteren bewirkte die P-Cadherin-Expression die zytoplasmatische Translokation des mesenchymalen Transkriptionsfaktors Snail, infolgedessen die Re-Expression von E-Cadherin in diesen OSCC-Zellen induziert wurde. Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde der Zusammenhang zwischen P-Cadherin und dem Slit/Robo-Signalweg untersucht. Durch Bindung sezernierter Slit-Proteine an ihre transmembranen Robo-Rezeptoren wird die Migration diverser Zellen kontrolliert. Experimente mit den P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen ergaben, dass die Slit-2-Expression und -Sekretion von der Funktionalität von P-Cadherin abhängig war. Zusätzlich regulierte Slit-2 über den Wnt-Signalweg seine eigene Expression, indem Slit-2 negativ auf den Transkriptionsfaktor beta-Catenin wirkte. Funktionell inhibierte Slit-2 die Migration von P-Cadherin exprimierenden OSCC-

Zellen durch Verstärkung der Interaktion von seinem Rezeptor Robo-3 mit dem Adhäsionsprotein P-Cadherin.

In dritten Teil dieser Dissertation wurden die Auswirkungen des P-Cadherin-Knockdowns auf die Differenzierung von gesunden, primären, oralen Keratinozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Verlust von P-Cadherin zur Differenzierung der gesunden, oralen Keratinozyten führte, was in einem signifikanten Anstieg der K1- und K10-Expression zu beobachten war. Interessanterweise zeigten OSCC-Keratinozyten nach P-Cadherin-Knockdown keine Veränderung in der K1/10-Expression. Als weiterer Beweis für die Beteiligung von P-Cadherin an der Keratinozytendifferenzierung zeigten FACS-Analysen, dass sich der Verlust von P-Cadherin negativ auf die Proliferation von gesunden, undifferenzierten Keratinozyten aus der oralen Mukosa auswirkte. Der zusätzliche Knockdown von C/EBP-beta hob in gesunden, oralen Keratinozyten diesen verzögerten Proliferationseffekt wieder auf, was beweist, dass P-Cadherin über C/EBP-beta die Differenzierung der gesunden oralen Keratinozyten kontrolliert.

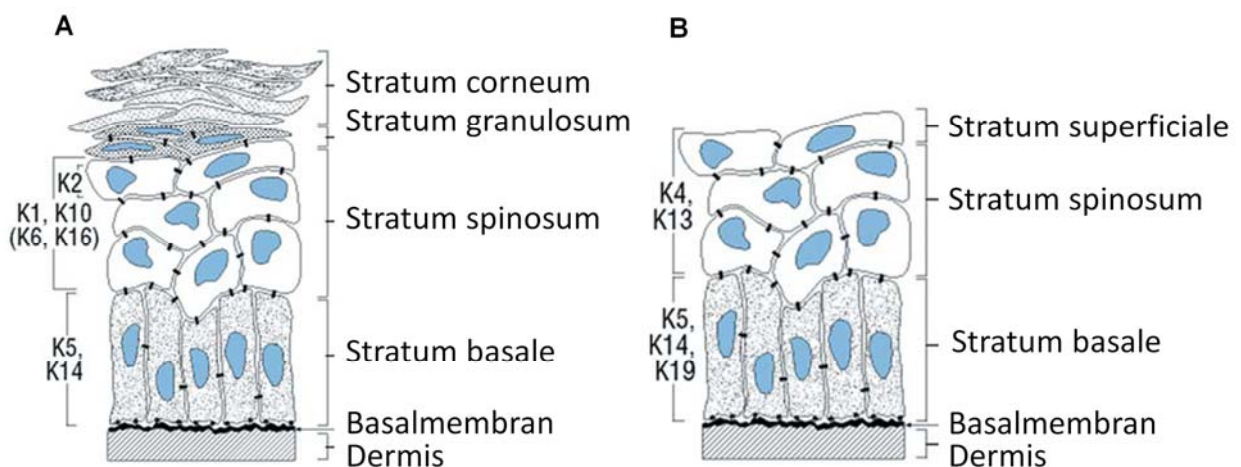


## 2 Einleitung

### 2.1 Das orale Epithel

#### 2.1.1 Aufbau und Funktion des oralen Epithels

Die orale Mukosa, welche aus dem oralen Epithel und dem darunterliegenden Bindegewebe besteht, kleidet die Mundhöhle aus. Das Epithel trennt dabei als primäre Barriere die tiefer liegenden, oralen Gewebe von der Mundhöhle ab (Ten Cate, 1998). Neben Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Melanozyten besteht das orale Epithel hauptsächlich aus Keratinozyten (Schenk, 1975). Diese Zellen bilden das aus mehreren, verschiedenen Zellschichten aufgebaute, orale Epithel. Dieses lässt sich aufgrund morphologischer und histologischer Unterschiede, welche durch den unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Keratinozyten bedingt sind, in drei (nicht-keratinisiertes Epithel, Abbildung 1B) bzw. vier Schichten (keratinisiertes Epithel, Abbildung 1A) gliedern (Ten Cate, 1998).



**Abbildung 1**  
Schematischer Aufbau eines oralen, mehrschichtigen keratinisierten (A) bzw. eines nicht-

**keratinisierten Epithels (B)** (K = Keratin) (verändert nach Presland *et al.*, 2002).

Während die überwiegenden Zellschichten des mehrschichtigen Epithels aus post-mitotischen, sich differenzierenden Zellen aufgebaut sind, enthält nur das zur Basalmembran anschließende *Stratum basale* mitotisch aktive Zellen. Im mehrschichtigen Epithel grenzt an diese basale Zellschicht das *Stratum spinosum* an. Die Keratinozyten dieser mehrlagigen Schicht sind über Desmosomen verbunden. Darüber befindet sich das *Stratum granulosum*. Die Keratinozyten dieser Zellschicht sind abgeflacht und enthalten basophile Keratohyalin granula. Dieser Schicht schließt sich das *Stratum corneum* an, welches aus flachen, kernlosen Keratinozyten besteht. In der Mundhöhle findet man dieses keratinisierte Epithel nur im Bereich des Zungenrückens. Die Mundschleimhaut des harten Gaumens und des Zahnfleisches besteht aus einem mehrschichtigen, teilweise keratinisierten, teilweise parakeratinisierten Epithel. Durch Parakeratinisierung bleiben bei der schrittweisen Differenzierung der Keratinozyten die Zellkerne im *Stratum corneum* erhalten. Der größte Teil der Mundhöhle (weicher Gaumen, Zungenunterseite, Mundboden, Innenseite der Wangen und der Lippe) besteht jedoch aus einem mehrschichtigen, nicht-keratinisierten Epithel. Die oberste Zellschicht dieses Epithels wird als *Stratum superficiale* bezeichnet. Sie enthält, im Gegensatz zum keratinisierten Epithel, noch lebende Zellen, die sich lediglich durch ihre Morphologie von den darunterliegenden Zellschichten unterscheiden (Ten Cate, 1998) (Presland und Dale, 2000) (Presland und Jurevic, 2002).

### 2.1.2 Aufbau und Funktion der Keratine

Keratine sind als Strukturproteine ein wesentlicher Bestandteil von Intermediärfilamenten in Epithelzellen. Neben Aktinfilamenten und Mikrotubuli tragen die Intermediärfilamente hauptsächlich zur mechanischen Stabilisierung der Zelle bei.

Die Mitglieder der großen Keratinfamilie werden entsprechend ihrer Ladung in die sauren Typ I-Keratine (K9 bis K23) und in die basisch-neutralen Typ II-Keratine (K1 bis K8) eingeteilt (Kirfel *et al.*, 2003) (Bragulla und Homberger, 2009). Im Epithel werden verschiedene Keratin-Paare, abhängig vom Zelltyp und vom Grad der Differenzierung, exprimiert (Fuchs und Green, 1980). Jeweils ein Keratin des Typ I und das dazugehörige Keratin des Typ II bilden Dimere, die sich zu Tetrameren

zusammenlagern. Durch Elongation der Tetramere entstehen die Keratin-Intermediärfilamente, welche die Zelle, verankert über Desmosomen, durchziehen und ihr als Teil des Zytoskeletts Form und Stabilität verleihen (Kirfel *et al.*, 2003) (Bragulla und Homberger, 2009).

### **2.1.3 Differenzierung der Keratinozyten**

Keratinozyten - der Hauptzelltyp im Epithelgewebe - entstehen aus Stammzellen in der Basalzellschicht. Diese teilen sich in neue Stammzellen und in sogenannte „*transient amplifying cells*“. Diese vorübergehend mitotisch aktiven Zellen replizieren sich vier- bis achtmal, bevor sie schließlich die Basalzellschicht verlassen (Bragulla und Homberger, 2009). Auf ihrem Weg vom *Stratum basale* zum *Stratum corneum* durchlaufen die Keratinozyten dabei verschiedene Differenzierungsstufen, welche mit einer Änderung der Morphologie und der Physiologie einhergehen. Begleitend dazu verändert sich je nach Differenzierungsstadium die Keratin-Expression. Kennzeichen der proliferativen Basalzellschicht des mehrschichtigen Epithels ist die Expression des Keratinpaares K5/14 (Abbildung 1A, B). Keratin-19 wird ebenfalls in dieser Zellschicht, jedoch nur im nicht-keratinisierten Epithel, exprimiert (Abbildung 1B). Differenzierende Keratinozyten der postmitotischen Zellschichten exprimieren, abhängig vom Keratinisierungsgrad, verschiedene Keratinpaare. Im *Stratum spinosum* des keratinisierten Epithels ersetzen die Keratine K1/10 das K5/14-Intermediärfilament-Netzwerk (Abbildung 1A). Im *Stratum spinosum* des nicht-keratinisierten Epithels werden statt dem Keratinpaar K5/14 hauptsächlich K4/K13 synthetisiert (Abbildung 1B). Mit Übergang zum *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* werden zusätzlich Strukturproteine exprimiert. Zusammen mit den Keratinen verstärken diese Hüllproteine, wie z. B. Involukrin und Lorikrin, durch Anlagerung von innen an die Zellmembran und an die Keratine, die terminal differenzierten Keratinozyten (Bragulla und Homberger, 2009) (Fuchs und Green, 1980) (Fuchs, 1988) (Presland und Jurevic, 2002).

## 2.2 Das orale Plattenepithelkarzinom

### 2.2.1 Epidemiologie

Das orale Plattenepithelkarzinom (*oral squamous cell carcinoma*, OSCC) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kopf-Hals-Bereiches. Mit ca. 650.000 Neuerkrankungen im Jahr stellen die Kopf-Hals-Tumore die sechsthäufigste Krebserkrankung weltweit dar (Argiris *et al.*, 2008). Trotz der verbesserten therapeutischen Möglichkeiten beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für OSCC-Patienten nur ca. 50% (Landis *et al.*, 1999). Das liegt zum einen an der Fähigkeit des OSCC zur frühen lymphogenen Metastasierung (Syrigos *et al.*, 2009). Zum anderen ist die schlechte Prognose durch die relativ späte Diagnosestellung aufgrund der fehlenden Schmerzsymptomatik im Frühstadium des OSCC bedingt (Hullmann *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms sind langjähriger Konsum von Alkohol und Tabak (Zygogianni *et al.*). Über 90% der OSCC-Fälle sind auf diese beiden Faktoren zurückzuführen. Die mehr als 300 karzinogenen Substanzen im Zigarettenrauch führen zur Bildung von freien Radikalen, welche die DNA der oralen Zellen schädigen (Zain, 2001). Zusätzlicher Konsum von Alkohol verstärkt diese karzinogene Wirkung von Tabak (Johnson, 2001). Dabei sind in den Industrieländern aufgrund des höheren Alkohol- und Tabakkonsums Männer zwei- bis dreimal häufiger von dieser Krankheit betroffen als Frauen (Johnson, 2001).

Neben den beiden klassischen Risikofaktoren spielt auch schlechte Mundhygiene bei der Entstehung des OSCC eine Rolle. Alkohol wird dabei durch die zahlreichen oralen Mikroorganismen zu dem kanzerogenen Acetaldehyd metabolisiert. Dieses toxische Molekül verletzt die Mukosa, indem es die für die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Cadherin/Catenin-Komplexe zerstört. Dadurch erhöht sich die parazelluläre Permeabilität für Endotoxine, was wiederum das Risiko einer OSCC-Bildung steigert (Meurman und Uttamo, 2008) (Sheth *et al.*, 2007).

Weiterhin wird vermutet, dass auch humane Papillomviren (HPV) an der Entstehung des OSCC beteiligt sind. Neue Daten belegen, dass Infektionen mit onkogenen HPV-Typen (z. B. HPV-16, HPV-18) über Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 und

pRb (*retinoblastoma protein*, Retinoblastom-Protein) zur Entwicklung des OSCC beitragen (Marur *et al.*, 2010) (Kreimer *et al.*, 2011).

Zusätzlich werden als weitere Risikofaktoren genetische Prädisposition, chronische Immunsuppression, ionisierende Strahlung sowie das Einatmen verschiedener Industriegifte (z. B. Nickel, Asbest) diskutiert (Marur und Forastiere, 2008).

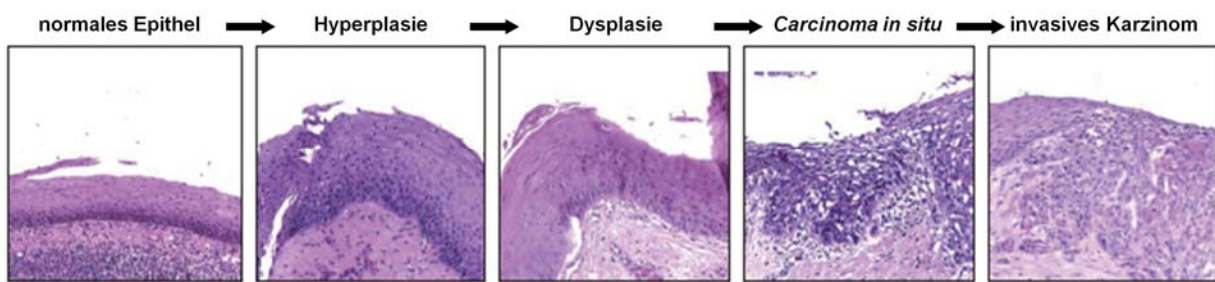
### 2.2.3 Tumorgenese

Der Großteil der oralen Plattenepithelkarzinome entwickelt sich aus präkanzerösen Läsionen, von denen die häufigsten die Leukoplakie und die Erythroplakie sind.

Bei der Leukoplakie handelt es sich um weiße, nicht abwischbare Mundschleimhautveränderungen, die klinisch und pathologisch keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden können (Kramer *et al.*, 1978). Orale Leukoplakien bilden sich in allen Bereichen der Mundhöhle, bevorzugt aber an der Wangenschleimhaut, dem Mundboden, der Zunge, den Lippen und dem Gaumen (Hunter *et al.*, 2005) (Hullmann *et al.*, 2010). Eine seltene, aber aggressive Variante der Leukoplakie ist die proliferative verruköse Leukoplakie. Sie beginnt als plane Hyperkeratose, die jedoch aufgrund ihrer hohen Transformationstendenz in ein verruköses Karzinom und schließlich in ein orales Plattenepithelkarzinom übergeht (Batsakis *et al.*, 1999).

Die Erythroplakie, als zweithäufigste präkanzeröse Läsion, wird als rötliche Mundschleimhautveränderung, die keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann, bezeichnet (Kramer *et al.*, 1978). Die bevorzugte Lokalisation der Erythroplakie ist der Mundboden, der Zungenrand sowie der Gaumen. Das Risiko einer malignen Entartung ist bei einer Erythroplakie mit über 50% gegenüber der Leukoplakie deutlich erhöht (Hunter *et al.*, 2005) (Hullmann *et al.*, 2010).

Der bereits erwähnte exzessive Nikotin- und Alkoholkonsum sowie virale Infektionen, genetische Prädisposition und chronische Entzündungen sind der Auslöser für die Entstehung derartiger Läsionen (Hullmann *et al.*, 2010) (Hunter *et al.*, 2005).



**Abbildung 2**

**Entstehung des invasiven Plattenepithelkarzinoms aus normalem, oralem Epithel** (Hematoxylin/Eosin-Färbung) (verändert nach Argiris *et al.*, 2008).

Durch Akkumulation diverser genetischer Aberrationen entwickeln sich diese Läsionen über mehrere Zwischenschritte (Dysplasie und *Carcinoma in situ*, Abbildung 2) in ein invasives Karzinom.

Diverse genetische Veränderungen, die im Zusammenhang mit der Entstehung des OSCC stehen, wurden bereits identifiziert. Generell führen die Aktivierung von Onkogenen durch Genamplifikation und Überexpression sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutationen und Deletionen zur Deregulierung der Zellproliferation und damit zur Tumorentstehung (Hardisson, 2003).

Zu den häufigsten Aberrationen im OSCC zählen die Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und p16 (Scully *et al.*, 2000). Die Funktion des p53 ist es, die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase (Phase vor der Synthese-Phase) des Zellzyklus zu arretieren, um DNA-Schäden zu reparieren, oder, bei nicht mehr zu behebbenden DNA-Schäden, die Apoptose zu induzieren. Durch fehlende p53-Aktivität verlieren die Zellen die Fähigkeit, in Apoptose überzugehen, und sind daher anfälliger für genomische Instabilität (Marur *et al.*, 2010) (Syrjanen, 2005). In 40% bis 60% der OSCC-Patienten ist dieses wichtige Protein mutiert. Diese Mutation wird hauptsächlich für den Übergang von einem prämaligen in ein invasives Karzinom verantwortlich gemacht (Marur und Forastiere, 2008). Das ebenfalls den Zellzyklus regulierende, zur Gruppe der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren gehörende p16 ist in 70% bis 80% der OSCC-Fälle modifiziert. Hauptgründe der p16-Inaktivierung, die in einer frühen Phase der OSCC-Progression stattfindet, sind vor allem homozygote Deletionen, Insertionen, Punktmutationen sowie Hypermethylierung (Hardisson, 2003).

In 95% der OSCC-Fälle ist eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktors und seines Rezeptors, dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), beobachtet worden. Da der EGFR-vermittelte Signal-

weg u. a. die Zellproliferation aktiviert, kommt es bei einer Überexpression zum unkontrollierten Wachstum der Keratinozyten (Marur und Forastiere, 2008).

Interessanterweise wurde in über 90% der oralen Karzinome eine reaktivierte Telomerase entdeckt (McCaul *et al.*, 2002). Aktive Telomerasen, welche für die Kompensierung der zellteilungsabhängigen Verkürzung der Telomere verantwortlich sind, besitzen nur Stamm-, Keim- und embryonale Zellen sowie die Haut und periphere Blutzellen (Lubbe *et al.*, 1997). In den meisten somatischen Zellen ist die Aktivität dieses Enzyms jedoch nicht mehr detektierbar. In Tumorzellen wird diese inaktive Telomerase auf noch unbekannte Art und Weise wieder reaktiviert und trägt so zur Immortalität der Karzinomzellen bei (McCaul *et al.*, 2002).

Bei einer durch HPV ausgelösten Kanzerogenese integriert die Virus-DNA ins Genom der Keratinozyten. Daraufhin werden die viralen Onkoproteine E6 und E7 exprimiert. Im Gegensatz zu Kanzerogenen, z. B. aus dem Zigarettenrauch, verändern diese viralen Proteine nicht die DNA, sondern hemmen funktionell die Tumorsuppressoren p53 und pRb (Marur *et al.*, 2010) (Syrjanen, 2005). Das virale Protein E6 bindet dabei an p53, ein Protein, welches maßgeblich an der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist, und induziert dessen Ubiquitinierung und Degradierung. Durch Bindung des viralen Proteins E7 an pRB wird der ebenfalls den Zellzyklus steuernde Tumorsuppressor inaktiviert. Durch das Arretieren der Zellen in der Synthese-Phase wird der Zellzyklus unterbrochen und es kommt zur vermehrten Zellproliferation, was letztendlich zur malignen Transformation der Keratinozyten führt (Marur *et al.*, 2010) (Syrjanen, 2005).

Diverse weitere genetische Aberrationen stehen zusätzlich mit der Karzinogenese des OSCC in Verbindung. Alterationen in Protoonkogenen (z. B. *c-myc*, Cyclin D1), welche an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind, sowie Veränderungen in Genen, die Teil des DNA-Reparatursystems sind, werden ebenfalls mit der OSCC-Entstehung assoziiert (Scully *et al.*, 2000).

## 2.3 Cadherine

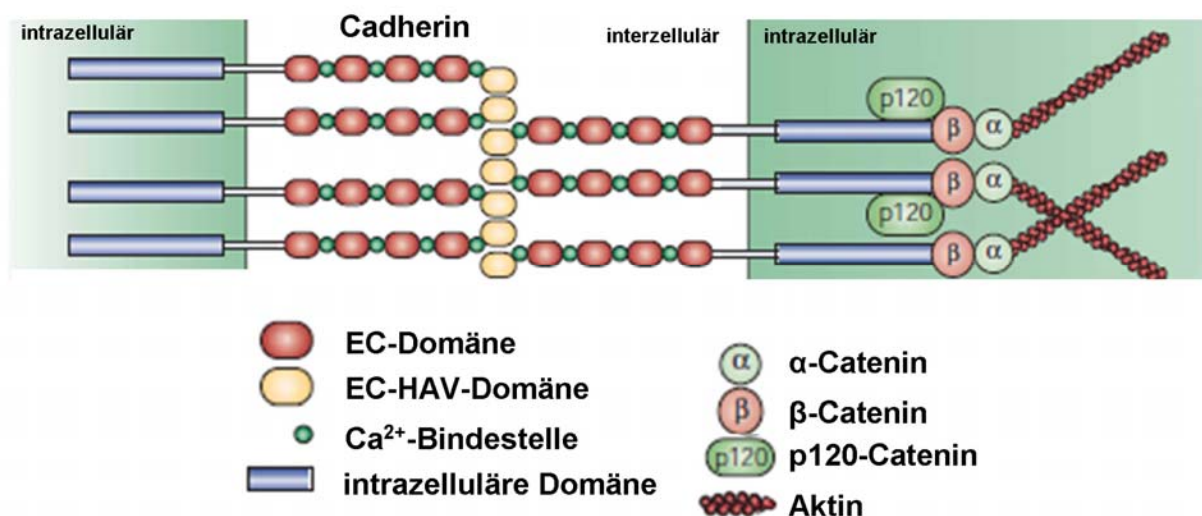
### 2.3.1 Aufbau und Funktion der Cadherine

Die Cadherine sind eine Familie von glykosylierten Adhäsionsmolekülen, welche kalziumabhängig Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Während der Embryogenese spielen

Cadherine bei der Entwicklung von Organen und Geweben eine wichtige Rolle. Im adulten Organismus sorgen diese Glykoproteine in Desmosomen und Adhärenzverbindungen durch Ausbildung homophiler Cadherin-Cadherin-Interaktionen für interzelluläre Adhäsion und somit für die Aufrechterhaltung der epithelialen Gewebestruktur (Pokutta und Weis, 2007) (Shapiro und Weis, 2009). Zur großen Familie der Cadherine zählen klassische Cadherine (Typ I und II), desmosomale Cadherine (Desmocolline und Desmogleine), Protocadherine sowie die Cadherin-verwandten Proteine. Die bekanntesten Cadherine, E-, N- und P-Cadherin, gehören zum Typ I der klassischen Cadherine (Halbleib und Nelson, 2006).

Die Cadherine bestehen als Membranproteine aus einer N-terminalen, extrazellulären Domäne, gefolgt von einer Transmembran-Domäne und einer C-terminalen, intrazellulären Domäne (Abbildung 3) (Pokutta und Weis, 2007). Der extrazelluläre Abschnitt setzt sich aus mehreren, sich wiederholenden extrazellulären Cadherin-Domänen (EC) zusammen. Zwischen diesen ECs befinden sich die Kalziumionen-Bindestellen, welche für die adhäsive Funktion der Cadherine von fundamentaler Bedeutung sind (Abbildung 3) (Shapiro und Weis, 2009).

Der extrazelluläre Teil der klassischen Cadherine besteht aus fünf ECs (EC1-EC5), wobei EC1 des Typ I der klassischen Cadherine die Aminosäuresequenz Histidin-Alanin-Valin (HAV) enthält, welche für die homophilen Cadherin-Cadherin-Interaktionen essentiell ist (Abbildung 3). Im Gegensatz zum Typ I fehlt dem Typ II der klassischen Cadherine dieses Motiv in der EC1-Domäne (Halbleib und Nelson, 2006) (Pokutta und Weis, 2007) (Shapiro und Weis, 2009).





**Abbildung 3**

**Aufbau der klassischen Cadherine** (verändert nach Cavallaro und Christofori, 2004).

Über die zytoplasmatischen Proteine p120-Catenin (p120), beta-Catenin und alpha-Catenin wird der stark konservierte intrazelluläre Teil der klassischen Cadherine mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden (Abbildung 3). Dabei bindet p120, ein Protein aus der Armadillo (arm)-Familie, über seine arm-Domäne an die Juxta-Membran-Region der zytoplasmatischen Cadherin-Domäne (Abbildung 3). Dort reguliert p120 zum einen die Endozytose-Rate der Cadherine, kontrolliert zum anderen die das Zytoskelett organisierenden kleinen GTPasen (Pokutta und Weis, 2007). Das hoch konservierte beta-Catenin bindet über seine arm-Domäne direkt an den C-terminalen Teil der Cadherine (Abbildung 3). An beta-Catenin wiederum binden alpha-Catenin sowie mehrere alpha-Catenin-Bindungspartner, welche einen Cadherin/Catenin-Komplex mit dem Zytoskelett der Zelle herstellen (Abbildung 3) (Leckband und Prakasam, 2006) (Pokutta und Weis, 2007) (Shapiro und Weis, 2009).

Zusätzlich zu ihrer adhäsiven Funktion beeinflussen Cadherine durch Interaktion mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), mit Komponenten des Wnt-Signalwegs bzw. mit Rho-GTPasen verschiedene Signalwege (Wheelock und Johnson, 2003).

Den RTK-Signalweg regulieren die Cadherine, indem sie über ihre extrazelluläre Domäne Ligand-unabhängig mit den RTK interagieren. Dadurch nimmt die RTK-Affinität für Liganden ab, was zur Inhibierung des RTK-Signalwegs führt (Andl und Rustgi, 2005) (Qian *et al.*, 2004).

Über p120 kontrollieren Cadherine die Effekte der Rho-GTPasen. Die Mitglieder der Rho-GTPase-Familie (RhoA, Rac1, Cdc42) sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion. Sie beeinflussen unterschiedliche Zellfunktionen, indem sie Signale von den Rezeptoren an die Effektoren weiterleiten. Nicht an Cadherine gebundenes, frei im Zytoplasma vorliegendes p120 kontrolliert die verschiedenen Rho-GTPasen. Dabei werden Rac1 und Cdc42 von p120 aktiviert, die Funktion von RhoA wird jedoch von p120 inhibiert (Fukata und Kaibuchi, 2001) (Wheelock und Johnson, 2003).

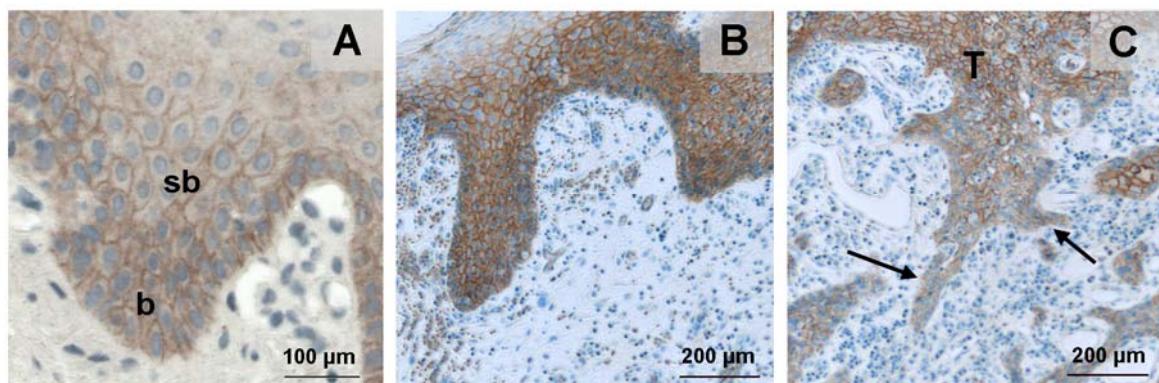
Indirekt nehmen Cadherine über beta-Catenin auch am Wnt-Signalweg teil. Der Wnt-Signalweg spielt eine sehr wichtige Rolle bei diversen Entwicklungsprozessen sowie bei der Tumorprogression. Beta-Catenin fungiert in diesem Signalweg als Schlüsselprotein, welches, wenn es nicht an Cadherine gebunden, sondern frei im Zytoplasma

vorliegt, in den Zellkern transloziert und dort zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Lef (*lymphoid enhancer factor*) / Tcf (*T cell factor*) die Transkription verschiedener Gene reguliert (Nelson und Nusse, 2004).

### 2.3.2 Aufbau und Funktion von P-Cadherin

P-Cadherin gehört aufgrund seiner fünf sich wiederholenden ECs und der HAV-Domäne in der EC1 zum Typ I der klassischen Cadherine. Dieses Adhäsionsprotein wird ausschließlich in den regenerativen basalen und suprabasalen Zellschichten des Epithels exprimiert (Munoz-Guerra *et al.*, 2005) (Lo Muzio *et al.*, 2004). Welche funktionelle Rolle P-Cadherin in diesen basalen und suprabasalen Keratinozyten neben der Aufrechterhaltung der epithelialen Architektur spielt, ist jedoch noch unbekannt.

In der gesunden, oralen Mukosa findet man P-Cadherin ausschließlich in basalen und suprabasalen Keratinozyten (Abbildung 4A). Entarten diese Zellen, so kann man im Anfangsstadium des OSCC (Dysplasie) eine Zunahme der P-Cadherin-Expression beobachten (Abbildung 4B und Williams *et al.*, 1998). Im invasiven OSCC verschwindet jedoch an der Invasionsfront das P-Cadherin aus der Zellmembran (Abbildung 4C, Pfeile). Gleichzeitig taucht trunkiertes P-Cadherin im Zytoplasma dieser Zellen auf (Bauer *et al.*, 2008) (Williams *et al.*, 1998). Die Abnahme von membranständigem P-Cadherin führt zum Verlust der Zell-Zell-Verbindungen, was die Mobilität der Karzinomzellen erhöht und somit das Auswandern der oralen Plattenepithelkarzinomzellen erleichtert.

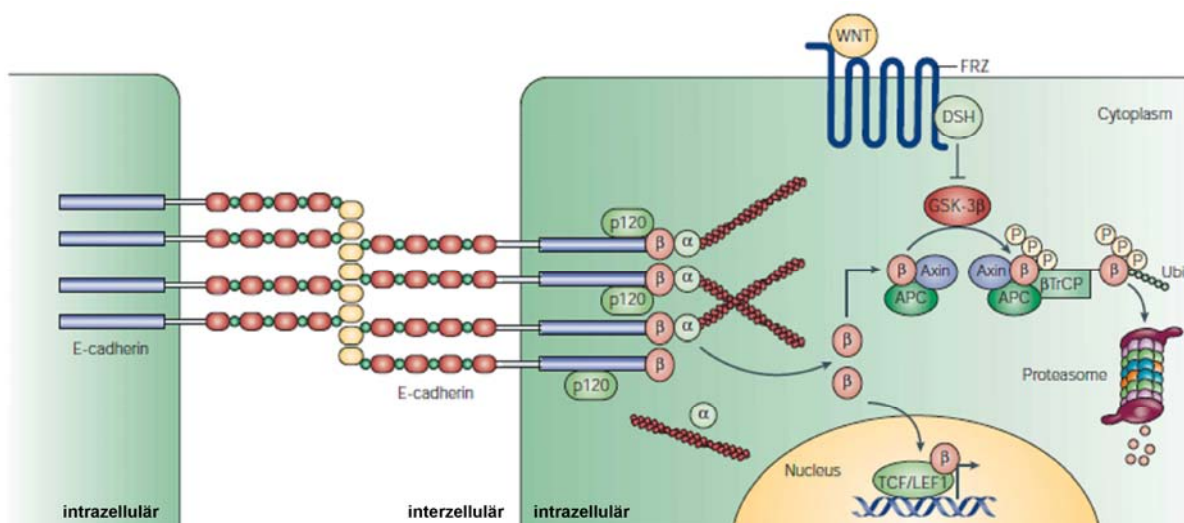


**Abbildung 4**  
P-Cadherin-Expression in der gesunden, oralen Mukosa (A), in der oralen Dysplasie (B) und im OSCC (C) (b = basal, sb = suprabasal, T = Tumor, Pfeil = Invasionsfront des OSCCs, eigene Aufnahmen).

## 2.4 Der Wnt/beta-Catenin-Signalweg

Neben der Beteiligung an der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion spielt beta-Catenin auch im kanonischen Wnt-Signalweg eine zentrale Rolle. Dort ist beta-Catenin, nach der Aktivierung dieses Signalwegs, als Transkriptionsfaktor an der Expression vieler Proteine beteiligt (Clevers, 2006).

In der Abwesenheit eines Wnt-Signals wird beta-Catenin, das nicht in Adhärenzverbindungen an Cadherine bindet, von einem Komplex aus GSK3-beta (Glycogen-Synthase-Kinase-3-beta), APC (*adenomatous polyposis coli*) und Axin phosphoryliert. Die Ubiquitinligase  $\beta$ TrCP ( *$\beta$ -transducin repeat-containing protein*) erkennt das phosphorylierte beta-Catenin und ubiquitiniert es. In Folge dessen wird das markierte beta-Catenin im Proteasom degradiert (Abbildung 5) (Clevers, 2006) (Nelson und Nusse, 2004).



**Abbildung 5**

**Die Rolle von beta-Catenin in der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion sowie im Wnt-Signalweg** (Legende siehe Abbildung 3) (verändert nach Cavallaro und Christofori, 2004).

Bei Bindung von Wnt-Proteinen an den transmembranen Rezeptor Frizzled (Frz) wird der Wnt-Signalweg aktiviert. Frz interagiert daraufhin mit dem zytoplasmatischen Protein Dishevelled (Dsh) und aktiviert dieses. In Folge dessen phosphoryliert das aktivierte Dsh die Serin/Threonin-Kinase GSK3-beta am N-terminalen Serin-9, wo-

durch die Aktivität dieser Kinase und somit des gesamten Multienzymkomplexes (GSK3-beta, APC, Axin) inhibiert wird (Doble und Woodgett, 2003). Beta-Catenin wird daraufhin nicht phosphoryliert, sondern akkumuliert im Zytoplasma. Es transloziert in den Zellkern und bindet an die Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf. Der Lef/Tcf/beta-Catenin-Komplex bindet an spezifische DNA-Sequenzen und initiiert dadurch die Transkription von Wnt-Zielgenen (Abbildung 5) (Clevers, 2006) (Nelson und Nusse, 2004).

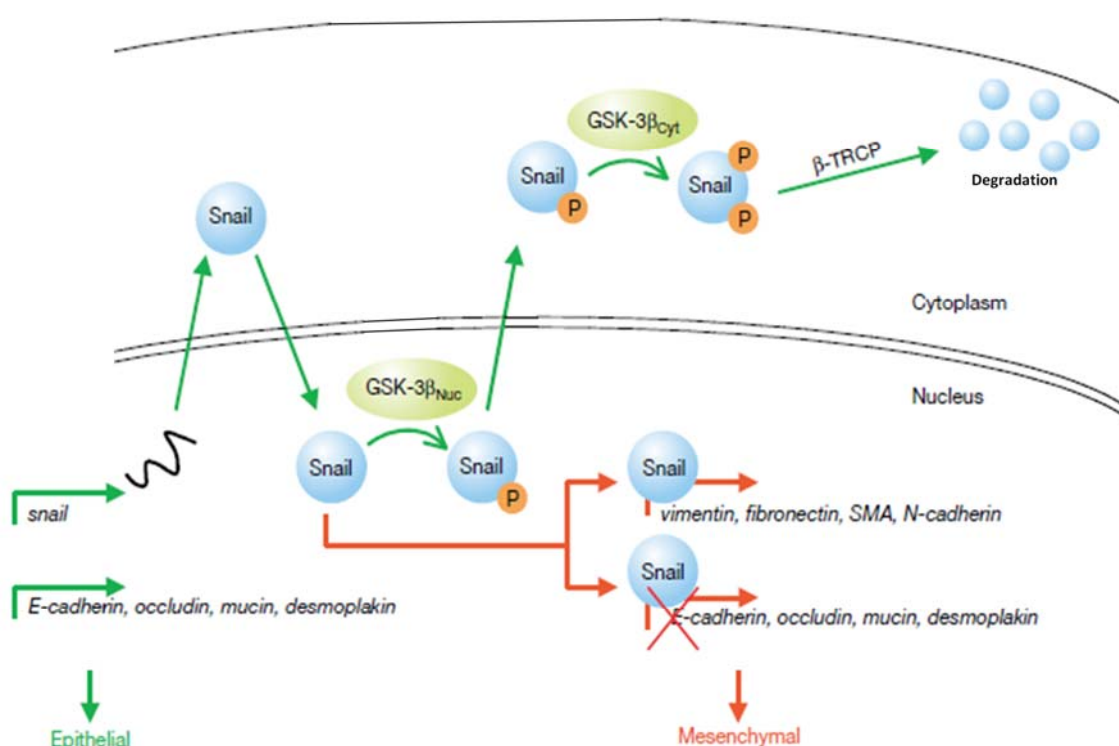
In den meisten, sich nicht teilenden Zellen ist GSK3-beta konstitutiv aktiv und zytoplasmatisches beta-Catenin wird in einem ständigen *Turnover* durch den GSK3-beta/APC/Axin-Komplex degradiert. In Tumorzellen jedoch weist eine erhöhte beta-Catenin-Konzentration im Zytoplasma und/oder im Zellkern auf die Stabilität von beta-Catenin hin und resultiert in verstärkter beta-Catenin-vermittelter Transkription von proliferationsfördernden Genen (Doble und Woodgett, 2003).

## 2.5 Die epithelial-mesenchymale Transition

Als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wird die Transformation von Zellen von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp bezeichnet. Bei diesem Vorgang erwerben epitheliale Zellen eine Fibroblasten-artige Morphologie. Diese ist verbunden mit dem Verlust von epithelialen Markern (z. B. Expression von E-Cadherin und Cytokeratine) und dem gleichzeitigen Gewinn von mesenchymalen Markern (z. B. Expression von Snail, Slug, Matrixmetalloproteasen, Vitronectin und N-Cadherin). Außerdem nimmt die Fähigkeit zur Zellmigration und -invasion zu (Kalluri, 2009) (Kalluri und Weinberg, 2009).

Während der Embryogenese sowie während der Wundheilung und Geweberegeneration ist der Prozess der EMT essentiell. Embryonale Zellen verwandeln sich durch kontrollierte EMT in Zellen mit migratorischem Phänotyp. An ihrem Zielort im Embryo angekommen, differenzieren sie dort zu spezifischen Zelltypen. Auch während der Wundheilung verändern sich basale Keratinozyten durch kontrollierte EMT in Zellen mit proliferativem Phänotyp. Diese Zellen zeichnen sich durch eine längliche, spindelförmige Morphologie aus, welche die Migration und Lokomotion der Zellen erleichtert. Nach dem Schließen der Wunde revertieren diese Fibroblasten-artigen Zellen jedoch wieder in Epithelzellen (mesenchymale zu epitheliale

Transition, MET) (Kalluri, 2009) (Kalluri und Weinberg, 2009). Im Gegensatz zu gesunden Zellen gewinnen transformierte Keratinozyten ihre epithelialen Eigenschaften dagegen nicht wieder zurück. Aufgrund ihres migratorischen Phänotyps lösen sich die Tumorzellen, welche die EMT durchlaufen haben, aus dem Tumorverband, durchdringen die Basalmembran, invadieren ins Nachbargewebe und durchlaufen hier, wenn auch manchmal unvollständig, eine MET (Kalluri, 2009) (Kalluri und Weinberg, 2009) (Lee *et al.*, 2006).



**Abbildung 6**

**Die Rolle von Snail in der Zelle.**

Grüne Pfeile markieren den Verlauf der Snail-Degradierung. Rote Pfeile markieren die Snail-induzierte Expression von mesenchymalen Proteinen (verändert nach Schlessinger und Hall, 2004).

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der EMT ist Snail. Die Expression dieses Zinkfingerproteins ist in vielen Tumorarten stark erhöht (Saito *et al.*, 2004) (Jiao *et al.*, 2002) (Hotz *et al.*, 2007). Die Aktivität bzw. der *Turnover* dieses Proteins wird von GSK3-beta kontrolliert. Diese Serin/Threonin-Kinase pendelt zwischen Zellkern und Zytoplasma, wo GSK3-beta entweder frei oder in einem Komplex mit APC und Axin vorliegt. In Abwesenheit von GSK3-beta akkumuliert Snail im Zellkern, bindet u. a. an E-Boxen im E-Cadherin-Promotor und unterdrückt dort als Repressor die Expression

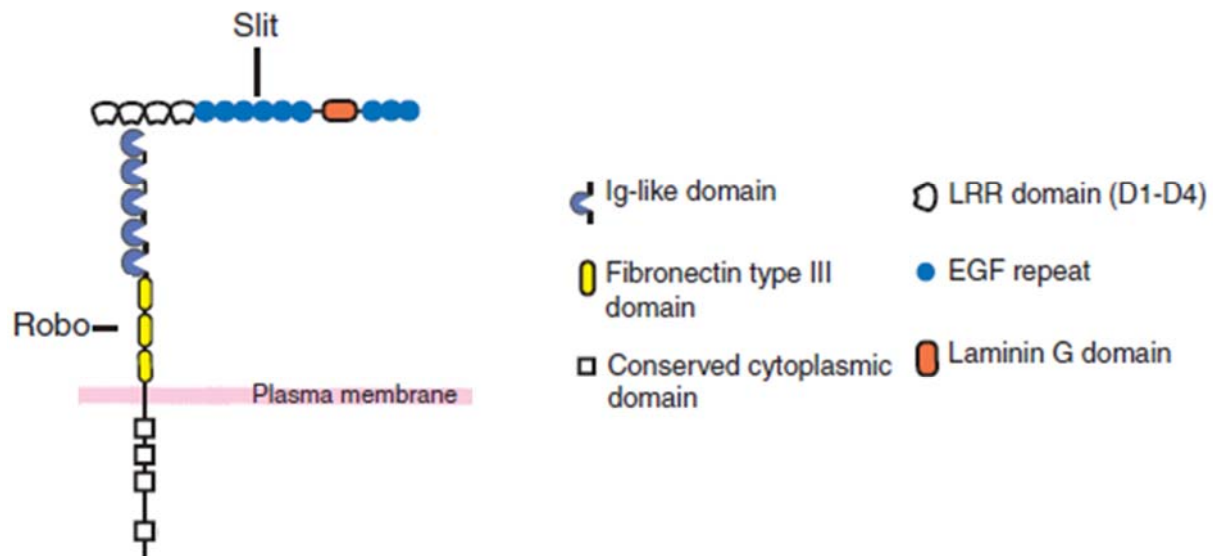
von E-Cadherin (Cano *et al.*, 2000) (Batlle *et al.*, 2000). Gleichzeitig fördert es als Transkriptionsfaktor die Expression von verschiedenen mesenchymalen Markern (Abbildung 6, rote Pfeile). Wird Snail jedoch von GSK3-beta im Zellkern phosphoryliert, kommt es zur Translokation von Snail ins Zytoplasma. Dort phosphoryliert GSK3-beta Snail ein weiteres Mal, was zur  $\beta$ TrCP-vermittelten Ubiquitinierung und anschließender Degradierung von Snail im Proteasom führt (Abbildung 6, grüne Pfeile) (Doble und Woodgett, 2003) (Schlessinger und Hall, 2004) (Yook *et al.*, 2006) (Zhou *et al.*, 2004).

## 2.6 Der Slit/Robo-Signalweg

Zelladhäsion und -migration spielen sowohl während der Entwicklung von Organen und Geweben als auch bei deren Aufrechterhaltung eine zentrale Rolle. An der Regulation dieser Prozesse sind diverse Adhäsionsproteine und Signalmoleküle beteiligt. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird die Regulation adhäsiver und migratorischer Prozesse u. a. mit Hilfe des erst kürzlich entdeckten Slit/Robo-Signalwegs gesteuert (Ypsilanti *et al.*, 2010). Da dieser Signalweg neben der Migration auch die Cadherin-vermittelte Adhäsion von nicht-neuronalen Zellen beeinflusst (Rhee *et al.*, 2002) (Rhee *et al.*, 2007) (Santiago-Martinez *et al.*, 2008) (Shiau und Bronner-Fraser, 2009) (Tseng *et al.*, 2010), wird in den folgenden Kapiteln der Aufbau und die Funktion des Slit/Robo-Signalwegs sowie die Rolle der Cadherine in diesem Signalweg dargestellt.

### 2.6.1 Aufbau und Funktion der Slit- und Robo-Proteine

Der typische Robo-Rezeptor besteht extrazellulär aus fünf Immunglobulin (Ig)-Domänen sowie aus drei Fibronectin-Typ III-Domänen. Der zytoplasmatische Teil des Rezeptors ist bis auf vier konservierte Domänen, an denen die Effektorproteine binden, weniger konserviert (Abbildung 7) (Dickson und Gilestro, 2006) (Guan *et al.*, 2003) (Ypsilanti *et al.*, 2010). In Vertebraten findet man vier verschiedenen Robo-Rezeptoren (Robo-1, Robo-2, Robo-3, Robo-4), die sich jedoch in der Anzahl ihrer konservierten Bausteine unterscheiden (Ypsilanti *et al.*, 2010).



**Abbildung 7**  
**Bindung von Slit an den Robo-Rezeptor** (verändert nach Ypsilanti *et al.*, 2010).

Die Liganden für die transmembranen Robo-Rezeptoren sind die Slit-Proteine, die bei den Vertebraten aus drei verschiedenen Slit-Proteinen (Slit-1, Slit-2, Slit-3) bestehen. Generell setzen sich diese Slit-Proteine aus vier Leucin-reichen Abschnitten (*leucin-rich repeats*, LRR) am N-terminalen Ende, gefolgt von einigen EGF-Wiederholungen, einer Laminin-G-Domäne und einer Cystein-reichen C-terminalen Region zusammen. Der wichtigste Abschnitt dieser großen, aus vielen Domänen bestehenden Proteine ist die LRR-Domäne, welche an die Ig-Domäne der Robo-Rezeptoren bindet (Abbildung 7). Durch anschließende Interaktion von verschiedenen Effektormolekülen an die intrazelluläre Robo-Domäne werden die Signale ins Innere der Zelle weitergeleitet. Über GAPs (*GTPase activating protein*, GTPase-aktivierendes Protein) und GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*, Guanin-Nukelotid-Austauschfaktor) regulieren unterschiedliche Rho-GTPasen die für die Migration wichtigen Veränderungen des Zytoskeletts (Dickson und Gilestro, 2006) (Guan *et al.*, 2003) (Ypsilanti *et al.*, 2010).

Ursprünglich wurde die Rolle des Slit/Robo-Signalwegs im ZNS beschrieben. Um während der Embryogenese die beiden Gehirnhälften über Axone miteinander zu verbinden, sezerniert die dazwischen liegende Mittellinie neben verschiedenen Signalmolekülen auch die repulsiv wirkenden Slit-Proteine. Diese verhindern zum einen das Überqueren der Mittellinie von ipsilateralen Neuronen und zum anderen nach dem Überqueren der Mittellinie das Zurückwandern von kommissuralen

Neuronen (Dickson und Gilestro, 2006) (Guan *et al.*, 2003) (Ypsilanti *et al.*, 2010). Mittlerweile weiß man, dass die Funktion der Slit- und Robo-Proteine jedoch nicht nur auf das ZNS beschränkt ist. In Vertebraten sind die Slit- und Robo-Proteine auch bei der Entwicklung der Lunge, Brust, Niere und des Herz-Kreislauf-Systems beteiligt. Darüber hinaus spielt der Slit/Robo-Signalweg bei Entzündungen sowie im Krebs eine wichtige Rolle (Chedotal *et al.*, 2005) (Hinck, 2004).

### **2.6.2 Die Rolle des Slit/Robo-Signalwegs außerhalb des Nervensystems**

Das ursprünglich im Nervensystem entdeckte Slit/Robo-System reguliert dort die Migration neuronaler Zellen sowie die Verzweigung von Axonen (Guan *et al.*, 2003) (Dickson und Gilestro, 2006) (Simpson *et al.*, 2000). Außerhalb des ZNS wirken sezernierte Slit-Proteine, die ihre Funktion über Robo-Rezeptoren vermitteln, auf verschiedene Zelltypen entweder repulsiv oder attraktiv. In der Literatur findet man zahlreiche Berichte, welche den Slit/Robo-Signalweg in Zusammenhang mit Zellen des Immunsystems und der Angiogenese sowie mit der Zelladhäsion bringen.

Im adaptiven Immunsystem kontrolliert Slit-2 als anti-inflammatorischer Faktor die Immunantwort. Bei Kontakt mit Allergenen schützt das in der Haut aktivierte Slit-2 vor einer übertriebenen Immunantwort, indem es die Wanderung der Allergen präsentierenden Langerhans-Zellen in periphere Lymphorgane und somit die Induktion einer Immunantwort verhindert (Guan *et al.*, 2003). Auch die gerichtete Chemotaxis von Leukozyten wird durch den neuronalen Repulsionsfaktor Slit-2 inhibiert (Wu *et al.*, 2001). In intakten Blutgefäßen exprimiertes Slit-2 verhindert die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Migration von vaskulären glatten Muskelzellen. Dieses in Blutgefäßen konstitutiv exprimierte Slit-2 soll die Auswanderung von vaskulären glatten Muskelzellen sowie die Einwanderung von Leukozyten verhindern (Liu *et al.*, 2006).

Erst kürzlich erschienene Berichte bringen den Slit/Robo-Signalweg auch mit der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion in Verbindung. Abhängig von der Zellart sowie vermutlich von weiteren Ko-Faktoren können Slit- und Robo-Proteine zusammen mit Cadherinen entweder die Zelladhäsion verstärken oder abschwächen. *In vivo*-Beobachtungen von Shiau *et al.* zeigen, dass sich der Slit/Robo-Signalweg positiv auf die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion während der kranialen Gangliogenese im Küken auswirkt. Dort ist N-Cadherin zusammen mit Slit-1 und Robo-2 bei der



Aggregation von sensorischen Neuronen in kranialen Ganglien beteiligt (Shiau und Bronner-Fraser, 2009). Im Gegensatz dazu berichten Rhee *et al.* von einer Inhibierung der Cadherin-Funktion durch den Slit/Robo-Signalweg. In Mausfibroblasten kommt es nach Slit-Aktivierung zur Bildung eines Robo-2/N-Cadherin-Komplexes. In Folge dessen phosphoryliert die Tyrosinkinase Abelson (Abl), welche an der C-terminalen Domäne des Robo-Rezeptors bindet, das am N-Cadherin gebundene beta-Catenin. Das phosphorylierte beta-Catenin dissoziiert daraufhin von N-Cadherin, wodurch die Cadherin/beta-Catenin-Verbindung mit dem Aktinzytoskelett gelöst wird, was zur Schwächung der Zelladhäsion führt (Rhee *et al.*, 2002) (Rhee *et al.*, 2007).

### 2.6.3 Die Rolle von Slit-2 im Tumor

In diversen Karzinomen findet man eine reduzierte oder fehlende Expression des Chemorepellents Slit-2. Analysen des Slit-2-Protomors ergaben die Anwesenheit zahlreicher Hypermethylierungen in CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Inseln der Promotorregion dieser Tumorzellen (Astuti *et al.*, 2004) (Dallol *et al.*, 2002) (Dallol *et al.*, 2003a) (Dallol *et al.*, 2003b). Diese epigenetische Inaktivierung von Slit-2 im Tumor weist auf tumorsuppressive Eigenschaften hin. Verschiedene *in vitro*-Experimente mit Karzinomzellen, in denen Slit-2 epigenetisch ausgeschaltet ist, führten nach Zugabe von exogenem Slit-2 zur Inhibierung des Zellwachstums, der Invasion und Metastasierung sowie zur Induktion der Apoptose (Kim *et al.*, 2008) (Yiin *et al.*, 2009) (Mertsch *et al.*, 2008) (Werbowetski-Ogilvie *et al.*, 2006) (Dallol *et al.*, 2003b). Obwohl aufgrund dieser Studien Slit-2 als Tumorsuppressor bezeichnet wird, ist sein tumorsuppressiver Effekt unter *in vivo*-Bedingungen sowie der grundlegende Mechanismus seiner tumorsuppressiven Eigenschaften noch nicht bekannt. Ein Signalweg, den Slit-2 beeinflusst, könnte der beta-Catenin/Wnt-Signalweg sein. Prasad *et al.* bzw. Tseng *et al.* untersuchten die Effekte von Slit-2 auf diesen Signalweg in Brust- bzw. Lungenkarzinomzellen (Prasad *et al.*, 2007) (Tseng *et al.*, 2010). Dabei entdeckten sie, dass Slit-2 zum einen über den Akt-Signalweg die Interaktion von beta-Catenin mit GSK3-beta verstärkt, was die Degradierung von beta-Catenin im Proteasom fördert. Zum anderen unterstützt Slit-2 durch Bindung von beta-Catenin an E-Cadherin die Zell-Zell-Adhäsion. Zusätzlich stimuliert Slit-2 durch Reduzierung der Snail-Expression die Expression von E-Cadherin, welches wiederum

freies beta-Catenin aus dem Zytoplasma bindet, den Transport von beta-Catenin in den Zellkern verhindert und dadurch die Proliferation der Karzinomzellen inhibiert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zellkulturmethoden

##### 3.1.1 Isolierung primärer, oraler Keratinozyten aus gesundem, mukosalem bzw. OSCC-Gewebe

Zur Isolierung primärer, oraler Keratinozyten wurde orales mukosales bzw. OSCC-Gewebe über Nacht (üN) mit 0,04% Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) (verdünnt in einer mit Phosphat gepufferten Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) (Sigma, Steinheim, Deutschland) verdaut. Am folgenden Tag wurde diese Reaktion durch Zugabe von 0,0125% Trypsin-Inhibitor (Invitrogen) gestoppt. Nachdem das Epithel mit einem Skalpells von der Submukosa getrennt worden war, wurde es in Medium aufgenommen und in beschichtete Zellkulturflaschen (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) verteilt. Um undifferenzierte Keratinozyten aus den isolierten Zellen zu filtern, wurden die Keratinozyten, als sie eine Konfluenz von 70% erreicht hatten, durch sequentielle Filtrierung nach ihrer Größe aufgetrennt. Ein 30 µm-Filter (Partec GmbH, Görlitz, Deutschland) entfernte zunächst die großen, differenzierten Keratinozyten. Nach einer erneuten Filtration durch einen 20 µm-Filter (Partec GmbH) erhielt man eine Zellpopulation aus primären Keratinozyten, welche kleiner als 20 µm waren (Barrandon und Green, 1987) (Izumi *et al.*, 2009).

##### 3.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Neben den in Kapitel 3.1.1 aus gesundem Patientengewebe isolierten, primären Keratinozyten wurden käuflich erworbene Keratinozyten verwendet. Diese humanen, oralen Keratinozyten (HOK) (ScienCell, San Diego, USA) wurden aus humanen, fötalen Keratinozyten isoliert. Beide Zelllinien (isolierte Keratinozyten und käuflich erworbene Keratinozyten) wurden im Folgenden als gesunde, primäre, orale Keratinozyten (gesunde POK) bezeichnet. Die aus dem OSCC gewonnenen Keratinozyten wurden im Folgenden als primäre, orale Keratinozyten aus OSCC-Gewebe (OSCC POK) bezeichnet.

Die gesunden POKs und OSCC POKs wurden in *EpiLife*-Medium (enthält 0,06 mM Calciumchlorid) (Invitrogen) mit 1% *EpiLife Defined Growth Supplement* (Invitrogen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Zellkulturflaschen mit *Dilution Medium* (Invitrogen) mit *Coating Matrix Kit* (1:100) (Invitrogen) 30 min bei Raumtemperatur (RT) beschichtet.

Die Kultivierung der OSCC-Zelllinien (Tabelle 1) erfolgte in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) (Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1% L-Glutamin (Gibco) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

OSCC-Zelllinie	Primärtumor	TNM-Klassifikation	Differenzierungsgrad
PCI 1	Larynx	T2N0M0	differenziert
PCI 13	Retromolares Dreieck	T4N1M0	differenziert
PCI 52	Aryepiglottische Falte	T2N0M0	undifferenziert
PCI 68	Zunge	T4N0M0	differenziert

**Tabelle 1**

**Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten OSCC-Zelllinien** (Heo *et al.*, 1989).

### 3.1.3 Transfektion

#### 3.1.3.1 Stabile Transfektion

Die Cadherin-defiziente OSCC-Zelllinie PCI52 wurde mit Hilfe von *FuGene HD* Transfektionsreagenz (Roche, Penzberg, Deutschland) stabil mit Volllänge P-Cadherin (Invitrogen) (2 µg) transfiziert (Klonierung von Volllänge P-Cadherin in den Vektor pcDNA 3.1D siehe Kapitel 3.2.1). Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Kulturplatten (BD Falcon) mit Medium ohne Antibiotika ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen stabil transfiziert. Zur Gewinnung von P-Cadherin exprimierenden Zellklonen wurden aus den transfizierten PCI52-Zellen einzelne Zellen unter Mikroskopkontrolle isoliert. Die auf diese Weise generierten P-Cadherin exprimierenden Zellklone erhielten die Bezeichnung PCI52\_PC1, PCI52\_PC2 und PCI52\_PC3. Zur Gewinnung von stabil transfizierten Kontroll-Zelllinien wurden PCI52-Zellen mit Hilfe von *FuGene HD* Transfektionsreagenz mit dem Leervektor pcDNA 3.1D transfiziert. Die generierten Kontroll-Zelllinien wurden

PCI52\_Mock1 und PCI52\_Mock2 genannt. Da der Vektor eine Resistenz gegen G-418 besitzt, wurde für die Selektion der stabil transfizierten PCI52-Zellen Geneticin (1,4 mg/ml) (Gibco) verwendet.

### 3.1.3.2 Transiente Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Kulturplatten mit Medium ohne Antibiotika ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen transient transfiziert (Tabelle 2). Zwei bzw. drei Tage nach der Transfektion wurde der mRNA-Knockdown mit Hilfe von quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (siehe Kapitel 3.2.4.2) bzw. der Protein-Knockdown mit Hilfe von Western Blot-Analysen (siehe Kapitel 3.3.3 bis 3.3.5) untersucht. Die transient transfizierten Zellen wurden anschließend für Immunfluoreszenzfärbungen (siehe Kapitel 3.3.11), für Migrationsexperimente (siehe Kapitel 3.1.4), für Analysen der mRNA- (siehe Kapitel 3.2.4.2) und Protein-Expression (siehe Kapitel 3.3.3 bis 3.3.5) bzw. für Experimente mit dem GSK3-beta-Inhibitor BIO (siehe Kapitel 3.1.5.1) verwendet.

Die Vektoren mit *antisense*-P-Cadherin, *antisense*-Snail, der kodierenden Sequenz für Snail bzw. der Leervektor pCMX-PL1 wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Anja Bosserhoff zur Verfügung gestellt.

Als Kontrolle für die siRNA (*small interfering RNA*)-Transfektionsexperimente wurde *scrambled siRNA* (*scr siRNA*) verwendet.

RNA/DNA	Transfektionsreagenz	Zellen
<i>antisense</i> -P-Cadherin (2 µg) <i>antisense</i> -Snail (2 µg) kodierende Sequenz für Snail (2 µg)	<i>FuGene HD</i> Transfektionsreagenz (Roche)	PCI52_PC PCI52_Mock
siRNA Robo-3 (20 µM) (Thermo Scientific, Bonn, Deutschland)	<i>Dharmafect-1</i> (Thermo Scientific)	PCI52_PC PCI52_Mock
siRNA E-Cadherin (2 µg) siRNA P-Cadherin (2 µg) siRNA C/EBP-beta (2 µg) (Thermo Scientific)	<i>Dharmafect-1</i>	PCI1 PCI13 PCI68
	<i>X-tremeGene HP DNA</i> Transfektionsreagenz (Roche)	POK

**Tabelle 2**

Die für die transiente Transfektion verwendeten Zellen und Reagenzien.

### 3.1.4 Migrationsexperimente

Die Migration der OSCC-Zellen wurde mit Hilfe der Boyden-Kammer untersucht. Das Prinzip der Boyden-Kammer beruht auf der Migration der Zellen entlang eines chemotaktischen Konzentrationsgradientens von einem Kompartiment durch eine poröse Membran in ein anderes Kompartiment (Boyden, 1962).

Zur Herstellung einer Boyden-Kammer wurden *ThinCert Cell Culture Inserts* (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) so in die *Wells* einer 24-Well-Kulturplatte (Greiner Bio-One) platziert, dass eine Migrationskammer mit einem oberen und einem unteren Kompartiment entstand. Die beiden Kammern wurden durch eine Membran mit 8 µm Porendurchmesser getrennt.

Um das Migrationsverhalten der PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen zu untersuchen, wurden diese Zellen jeweils in das obere Kompartiment in DMEM-Medium mit 0,2% bovinem Serum-Albumin (BSA) (Sigma) ausgesät. Das untere Kompartiment wurde mit Fibroblasten-konditioniertem Medium, welches als Chemoattraktanz diente, gefüllt. Die ausgesäten Zellen wurden 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, die zur Unterseite der Membran gewandert waren, 45 min mit 8 µM Calcein-AM (Calbiochem, Nottingham, UK) gefärbt. Durch 20-minütige Trypsinierung wurden sie daraufhin von der Unterseite der Membran abgelöst. Die Anzahl der durch die Membran migrierten Zellen wurde im *Tecan GENios Microplate Reader* (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen.

Um das Migrationsverhalten der PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen während der Inkubation mit dem Chemorepellent Slit-2 zu untersuchen, wurden die PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen mit 10 ng, 100 ng bzw. ohne rekombinantem, murinem (rm) Slit-2 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) in das obere Kompartiment in DMEM-Medium mit 0,2% BSA ausgesät und 4,5 h bei 37°C inkubiert. Das untere Kompartiment wurde mit DMEM-Medium mit 10% FKS gefüllt. Nach der Inkubation wurde der Migrationsversuch, wie oben beschrieben, fortgeführt.

Um das Migrationsverhalten der PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen nach Robo-3-Knockdown zu untersuchen (siehe Kapitel 3.1.3.2), wurden die mit siRNA Robo-3 transfizierten Zellen in das obere Kompartiment in DMEM-Medium mit 0,2% BSA ausgesät und 4,5 h bei 37°C inkubiert. Das untere Kompartiment wurde mit DMEM-Medium mit 10% FKS gefüllt. Nach der Inkubation wurde der Migrationsversuch, wie oben beschrieben, fortgeführt.

### **3.1.5 Inhibierung von GSK3-beta**

#### **3.1.5.1 Inhibierung von GSK3-beta mit Hilfe des Inhibitors BIO**

Um GSK3-beta zu inhibieren (Meijer *et al.*, 2003), wurden die transient transfizierten gesunden POKs und OSCC POKs 24 h mit dem GSK3-beta-Inhibitor BIO (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) bzw. mit DMSO (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert (siehe Kapitel 3.2.2.1).

#### **3.1.5.2 Inhibierung von GSK3-beta mit Hilfe von Lithiumchlorid**

Die Inhibierung von GSK3-beta erfolgte durch Inkubation der PCI52\_PC-Zellen 30 h mit 20 mM Lithiumchlorid (LiCl) (Merck). Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (*radioimmunoprecipitation assay*) (Sigma) lysiert (siehe Kapitel 3.3.1).

### **3.1.6 Inhibierung des beta-Catenin/Lef/Tcf-Komplexes**

Zur Verhinderung der Bindung des Transkriptionsfaktors beta-Catenin an Lef/Tcf (Handeli und Simon, 2008), wurden die PCI52\_Mock-Zellen 24 h mit dem beta-Catenin/Lef/Tcf-Inhibitor FH 535 (20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) (Calbiochem) bzw. mit DMSO inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert (siehe Kapitel 3.2.2.1).

### **3.1.7 C/EBP-beta Luciferase Reporter Gen Assay**

Zur Messung der transkriptionellen Aktivität von C/EBP-beta wurde ein C/EBP-beta *Luciferase Reporter Gen Assay* durchgeführt. Gesunde POKs wurden mit siRNA gegen P-Cadherin und mit einem C/EBP-Reporter (Qiagen, Hilden, Deutschland) transfiziert. Der C/EBP-Reporter ist eine Mischung eines induzierbaren, C/EBP-abhängigen *Firefly*-Luciferase-Konstrukts und eines konstitutiv exprimierenden Renilla-Luciferase-Konstrukts. Das Renilla-Luciferase-Konstrukt wurde zur Normalisierung der Transfektionseffizienz verwendet. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Mannheim, Deutschland) für die Messung der *Firefly*- und Renilla-Luciferase geerntet. Dazu wurden die Zellen nach dem Entfernen des Zellmediums 20 min mit 1x *Passive Lysis Buffer* inkubiert. Daraufhin wurden 50  $\mu$ l des Zelllysates

und 50 µl *Luciferase Assay Reagent II* in Luminometer-Röhrchen pipettiert und mit Hilfe des Luminometer DLReady (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) die *Firefly*-Luciferase-Aktivität in *relative light units* gemessen. Anschließend wurden 50 µl *Stop&Glo Reagent* in das Luminometer-Röhrchen pipettiert und die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine Mischung eines nicht-induzierbaren *Firefly*-Luciferase-Konstrukts und eines konstitutiv exprimierenden Renilla-Luciferase-Konstrukts (Qiagen) verwendet.

### 3.1.8 Durchflusszytometrische Analyse

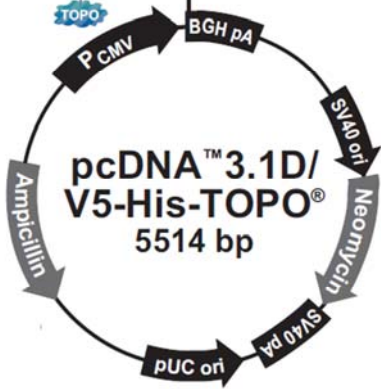
Zur Messung der Proliferation wurden gesunde und OSCC POKs in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und mit siRNA P-Cadherin, mit siRNA P-Cadherin und siRNA C/EBP-beta bzw. mit *scrambled* siRNA transient transfiziert (siehe Kapitel 3.1.3.2). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1 µM Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) (Molecular Probes, Darmstadt, Deutschland) in PBS für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde CFSE durch Zellkulturmedium ersetzt. CFSE ist ein Fluorescein-Derivat, das zellpermeabel und nicht-fluoreszierend ist. Nach Abspaltung von Acetat-Gruppen durch zelluläre Esterasen bleibt ein fluoreszierendes und immanentes Molekül in der Zelle zurück, mit dessen Hilfe in FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analysen die Zellproliferation analysiert werden kann. Drei bzw. vier Tage nach der CFSE-Behandlung wurden die Zellen mit Trypsin geerntet, in 2% BSA/PBS resuspendiert und für durchflusszytometrische Analysen verwendet. Mit Hilfe des FACS Caliburs (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden jeweils 70.000 Zellen gezählt und bei einer Fluoreszenz von 492 nm gemessen. Die Auswertungen erfolgten anschließend mit dem Softwareprogramm *FlowJo*.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Klonierung

Komplementäre DNA von humanem P-Cadherin (in einem pBluescriptR Vektor) (Imagene, Berlin, Deutschland) wurde an den Restriktionsstellen 5' mit *BamH I* bzw. 3' mit *Nde I* geschnitten und ohne die 5'- bzw. 3'-untranslatierenden Regionen in den Vektor pcDNA 3.1D (Abbildung 8) kloniert.





**Abbildung 8**  
**Klonierungsvektor pcDNA 3.1D/V5-His-Topo (Invitrogen).**

### 3.2.2 RNA-Isolierung

### 3.2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen

RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) aus Zellen isoliert. Die Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen und mit *RLT-Lysis Buffer* mit beta-Mercaptoethanol (1:100) lysiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen mit gleichem Volumen 70% Ethanol versetzt. Die von der Kulturschale abgelösten Zellen wurden auf eine Zentrifugationssäule aufgetragen und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 350 µl *RW1-Wash Buffer* auf die Säule aufgetragen und erneut 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zum Abbau der genomischen DNA wurden die lysierten Zellen mit 10 µl *DNase I* und 70 µl *RDD-Buffer* 15 min inkubiert. Zum Waschen der Säule wurden im Anschluss 350 µl *RW1-* (15 sec, 10.000 rpm), 500 µl *RPE-* (15 sec, 10.000 rpm) sowie 500 µl *RPE-Wash Buffer* (2 min, 13.000 rpm) verwendet. Die RNA wurde daraufhin mit 20 µl Wasser eluiert (1 min, 10.000 rpm) und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.2.2 RNA-Isolierung aus Gewebe

Mit einem Skalpell wurde ein Gewebestück (circa 250 mg) aus einer gefrorenen gesunden, oralen Mukosa bzw. aus einem OSCC-Gewebestück geschnitten. Dieses wurde in *RLT-Lysis Buffer* (aus *RNeasy Mini Kit*) mit Hilfe eines Homogenisators

(Precellys ®24, Bertin Technologies, Erlangen, Deutschland) homogenisiert. Daraufhin wurde das gleiche Volumen 70% Ethanol zu dem Homogenisat hinzugefügt. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits*, wie im Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, isoliert.

### 3.2.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe des *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kits* (Roche) wurden 1 µg RNA in cDNA (*copy DNA*) umgeschrieben. Tabelle 3 zeigt den für die cDNA-Synthese verwendeten Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
3 µl RNA 1 µl <i>Anchored-oligo (dT)<sub>18</sub> Primer</i> 2 µl <i>Random Hexamer Primer</i> 7 µl Wasser	→ 65°C 10 min
4 µl <i>Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer (5x)</i> 0,5 µl <i>Protector RNase Inhibitor</i> 2 µl <i>Deoxynucleotide Mix</i> 0,5 µl <i>Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase</i>	→ 25°C 10 min 55°C 30 min 85°C 5 min

**Tabelle 3**  
Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die cDNA-Synthese.

### 3.2.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

#### 3.2.4.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit SybrGreen

Die Tabellen 2-4 zeigen das Temperaturprofil, den Reaktionsansatz sowie die verwendeten Primer (MWG, Ebersberg, Deutschland) für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) mit *SybrGreen* (Sigma).

Die Expressionsanalyse des Zielgens wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Genexpression des Zielgens wurde auf das Haushaltsgen beta-Aktin normiert.

Anzahl der Zyklen	Temperaturprofil
1	95°C 6 min 40 sec
45	95°C 30 sec 61°C 10 sec 72°C 14 sec
1	95°C 1 min 59°C 30 sec 95°C 30 sec

**Tabelle 4**  
Temperaturprofil für die qPCR mit *SybrGreen*.

Herstellung des 2x <i>SybrGreen</i> -Mix	Reaktionsansatz
200 µl Puffer Y (PeqLab, Erlangen, D) 40 µl dNTPs (10 mM) (Promega) 40 µl 10x <i>SybrGreen</i> 720 µl Wasser	3 µl cDNA (1:10) 10 µl 2x <i>SybrGreen</i> -Mix 0,5 µl <i>forward primer</i> 0,5 µl <i>reverse primer</i> 0,1 µl <i>Taq</i> -Polymerase (PeqLab) 6 µl Wasser

**Tabelle 5**  
Reaktionsansatz für die qPCR mit *SybrGreen*.

Gen	Primer-Sequenz (5' → 3')
beta-Aktin	ccaaccgcgagaagatg tccatcacgatgccagtg
Vitronectin	catggctggccgcatctacatctcag gagcgatggagcgtgggtagggag

**Tabelle 6**  
Primer für die qPCR mit *SybrGreen*.

### 3.2.4.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit *TaqMan*-Sonden

Das Prinzip der *TaqMan*-Sonden beruht auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase, welche die Fluoreszenz der Sonden während der qPCR freisetzt. Die *TaqMan*-Sonde, die an ihrem einen Ende mit einem *Quencher* und an ihrem anderen Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, hybridisiert während eines PCR-Zyklus mit dem komplementären DNA-Strang, welcher zwischen den Primern liegt. Aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität baut die *Taq*-Polymerase die Sonde ab. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff vom *Quencher* getrennt und die Fluoreszenz kann am Ende der Elongation in jedem Zyklus gemessen werden (Holland *et al.*,

1991). Für die qPCR mit dem *Brilliant II Fast qPCR Master Mix* (Stratagene Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und mit *TaqMan*-Sonden (Roche) wurden folgendes Temperaturprofil, folgender Reaktionsansatz und folgende Primer verwendet:

Anzahl der Zyklen	Temperaturprofil
1	95°C 2 min
40	95°C 12 sec 60°C 45 sec 72°C 10 sec

Tabelle 7

Temperaturprofil für die qPCR mit *Brilliant II Fast qPCR Master Mix*.

### Reaktionsansatz

12,5 µl *Brilliant II Fast qPCR Master Mix*  
 3 µl cDNA (1:10)  
 0,5 µl *forward primer*  
 0,5 µl *reverse primer*  
 0,5 µl *TaqMan*-Sonde  
 8 µl Wasser

Tabelle 8

Reaktionsansatz für die qPCR mit *Brilliant II Fast qPCR Master Mix*.

Gen	<i>TaqMan</i> -Sonde	Primer-Sequenz (5' → 3')
beta-Aktin	# 11	attggcaatgagcgggtc
		tgaaggtagtttcgtggatgc
C/EBP-beta	# 74	cgctacctcggctacca
		acgaggaggacgtggagag
E-Cadherin	# 83	cgatggcattttgaaaacag
		atcacatccagcacatcca
Keratin-1	# 65	tgcacaatgtcaagaagcaga
		gtcttccttggcctgctg
Keratin-5	# 59	gttgaccagtcaacatctctg
		ctgctacctccggcaaga
Keratin-10	# 64	ccatcgatgaccttaaaaatcag
		gcagagctacctcattctcatactt
Keratin-14	# 64	gtcccagctcagcatgaaa
		gcagtagcgaccttgggtct
P-Cadherin	# 61	gctggggaaagtattcatgg
		ccttcagtgaccttcttctctg
Robo-3	# 65	acatccctcaggagatctgg
		tcactttgcctcccttgg
Slit-1	# 34	ggcccagtgatggatgaag
		ggatctcacagagctgtccac

Slit-2	# 12	catggaggaacttgccactta tccatcagcacaatacacca
Slit-3	# 34	accgcttcagtgcaaag gcatgtcccgttattcttgc

**Tabelle 9****Primer für die qPCR mit Brilliant II Fast qPCR Master Mix.**

Die Expressionsanalysen der Zielgene wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Genexpression der Zielgene wurde auf das Haushaltsgen beta-Aktin normiert.

### 3.2.5 Humaner Stammzell-Array

Nach der transienten Transfektion von HOKs mit siRNA P-Cadherin (siehe Kapitel 3.1.3.2) wurde die RNA der Zellen isoliert (siehe Kapitel 3.2.2.1) und 1 µg RNA mit Hilfe des *RT First Strand Kits* (SaBiosciences, Hilden, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Tabelle 10 zeigt den für die cDNA-Synthese verwendeten Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil. Die cDNA wurde anschließend für den *Human Embryonic Stem Cell Array* (SaBiosciences), der dreimal wiederholt worden war, verwendet (Tabelle 11). Der Stammzell-Array enthält Primer der kodierenden Sequenz von Genen, welche an der Stammzell-Proliferation und -Differenzierung beteiligt sind.

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
3 µl RNA 2 µl gDNA <i>Elimination Buffer</i> (5x) 5 µl Wasser	→ 42°C 5 min 4°C 1 min
4 µl <i>Reverse Transcription Buffer 3</i> 1 µl <i>Primer and External Control Mix</i> 2 µl <i>RT Enzyme Mix 3</i> 3 µl Wasser	→ 42°C 15 min 95°C 5 min
91 µl Wasser	

**Tabelle 10****Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die cDNA-Synthese mit dem *RT First Strand Kit*.**

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
1350 µl <i>RT Real-Time SYBR Green/ROX PCR Master Mix</i>	1x 95°C 11 min
102 µl cDNA	40x 95°C 15 sec
1250 µl Wasser	40x 60°C 1 min

**Tabelle 11****Reaktionsansatz und Temperaturprofil für den *Human Embryonic Stem Cell Array*.**

### **3.2.6 Isolierung genomischer DNA, Bisulfit-Modifikation und Analyse des E-Cadherin-Promotors mit Hilfe von methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion**

Genomische DNA (gDNA) wurde mit Hilfe des *Wizard Genomic DNA Purification Kits* (Promega) isoliert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Medium aufgenommen und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands (ÜS) wurde erneut gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 600 µl *Nuclei Lysis Solution* resuspendiert und nach Zugabe von 3 µl *RNase Solution* 20 min bei 37°C und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl *Protein Precipitation Solution* wurden die Zellen kurz geschüttelt, 5 min auf Eis inkubiert und 4 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der ÜS wurde mit 600 µl Isopropanol 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 600 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Nach dem Trocknen der DNA wurde diese in 100 µl *DNA Rehydration Solution* aufgenommen, 1 h bei 65°C inkubiert und bei 4°C aufbewahrt.

Im Anschluss an die gDNA-Isolierung wurde der Methylierungsstatus der CpG-Inseln in der E-Cadherin-Promotor-Region analysiert. Das Prinzip der Bisulfit-Modifikation basiert auf der Konvertierung von unmethylierten Cytosin-Resten zu Uracil in der gDNA. Methylierte Cytosine sind resistent gegen die Bisulfit-Behandlung. Für die Bisulfit-Konversion und die daran anschließende Aufreinigung der gDNA wurde der *Imprint DNA Modification Kit* (Sigma) verwendet. Dazu wurden 10 µl gDNA mit 110 µl *DNA Modification Solution* zuerst 6 min bei 99°C, anschließend 90 min bei 65°C inkubiert. Daraufhin wurde die modifizierte DNA in einer mit *Capture Solution* vorbereiteten Zentrifugationssäule zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte bei 12.000 rpm). Nach Zugabe von 200 µl *Cleaning Solution* wurde erneut zentrifugiert. Nach Inkubation der DNA mit 50 µl *Balance/Ethanol Wash Solution* (8 min), wurde erneut zentrifugiert. Daraufhin wurde die DNA zweimal mit 200 µl 90% Ethanol gewaschen, bevor sie mit 10 µl *Elution Solution* von der Säule eluiert wurde. Die modifizierte DNA wurde daraufhin mit Primern spezifisch für die methylierte bzw. unmethylierte E-Cadherin-Promotor-Sequenz amplifiziert (Tabelle 12). Die methylierungsspezifische PCR (MSP) erfolgte nach einem Denaturierungsschritt (94°C 2 min) für 35 Zyklen nach folgendem Temperaturprofil: Denaturierung 94°C 30 sec, Annealing 56°C 30 sec, Elongation 72°C 30 sec. Die entstandenen PCR-Produkte

(methyliert: 116 bp, unmethyliert: 97 bp) wurden auf einem 7,5% Tris-Borat-Ethylendiamin (TBE)-Tetra-Essigsäure-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Tabelle 13). Als Kontrolle für einen methylierten bzw. unmethylierten E-Cadherin-Promotor wurde CpG-methylierte HeLa gDNA bzw. HeLa gDNA (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet.

Primer für den E-Cadherin-Promotor	Primer-Sequenz (5' → 3')
methyliert	ttaggtagaggggtatcgcg
	taactaaaaattcacctaccgac
unmethyliert	taatttaggtagagggt
	cacaaccaatcaacaacaca

**Tabelle 12**  
Primer für die MSP.

TBE-Puffer	7,5% TBE-PAA-Gel
89 mM Tris (Merck)	4,3 ml Wasser
89 mM Borsäure (Roth)	1,9 ml Acrylamid (40%) (Roth)
2 mM EDTA-N <sub>2</sub> (Roth)	3,75 ml TBE
	50 µl APS (10%) (Sigma)
	10 µl TEMED (Sigma)

**Tabelle 13**  
Reagenzien für den TBE-Puffer sowie für das TBE-PAA-Gel.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Proteingewinnung aus Zellen

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurden die Zellen mit 0,04% Trypsin (1 ml, 2 min) (PAA, Cölbe, Deutschland) von der Zellkulturschale gelöst, zentrifugiert (5 min, 1.200 rpm), mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 1.200 rpm). Das Pellet wurde in RIPA-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall (2 Zyklen, 20 sec, 75% *power*) behandelt. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt (13.000 rpm bei 4°C) wurde der Überstand abgenommen und bis zur Proteinquantifizierung bei 4°C aufbewahrt.

### 3.3.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mit Hilfe eines BCA-Tests (Calbiochem) ermittelt. Dieser Assay basiert auf der alkalischen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , welches mit Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) einen violetten Farbkomplex bildet, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann. Für den BCA-Test wurden 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz (50 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B) mit 10  $\mu\text{l}$  Zelllysate bzw. BSA-Standard 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im *Tecan GENios Microplate Reader* bei 562 nm gemessen. Anhand des BSA-Standards wurde daraufhin die Proteinkonzentration der Zelllysate ermittelt.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf einem SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetrennt. Dazu wurden die Zelllysate mit Roti-Load1 (Roth) versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf einem SDS-PAA-Gel (10% Trenngel und 4% Sammelgel, Tabelle 14) bei 20 mA/Gel aufgetrennt.

Gele und Puffer für SDS-PAGE	Konzentration der Inhaltsstoffe
10%iges Trenngel	3,6 ml Wasser 2,5 ml Acrylamid (40%) 3,75 ml 1 M Tris pH 8,8 100 $\mu\text{l}$ SDS (10%) (Sigma) 50 $\mu\text{l}$ APS (10%) 10 $\mu\text{l}$ TEMED
4%iges Sammelgel	2,85 ml Wasser 375 $\mu\text{l}$ Acrylamid (40%) 450 $\mu\text{l}$ 1 M Tris pH 6,8 37,5 $\mu\text{l}$ SDS (10%) 25 $\mu\text{l}$ APS (10%) 3,5 $\mu\text{l}$ TEMED
Elektroden-Puffer	50 mM Tris pH 8,5 40 mM Glycin (Merck)

**Tabelle 14**  
Inhaltsstoffe des Trenn- und Sammelgels sowie des Elektroden-Puffers.



### 3.3.4 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels elektrophoretischen Transfers (Tank-Blot, 140 mA, 1 h 20 min, Tabelle 15) auf eine PVDF-Membran (Roche) übertragen.

Puffer für den Western Blot	Konzentration der Inhaltsstoffe
Blot-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,5
	40 mM Glycin
	10% Methanol (Merck)

**Tabelle 15**  
Inhaltsstoffe des Blot-Puffers.

### 3.3.5 Proteindetektion auf Western Blots

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Blotten 1 h mit 3% BSA in PBS mit 0,1% Tween 20 (PBST) blockiert. Anschließend folgte die Inkubierung der Membran üN bei 4°C mit dem Primärantikörper (in 3% BSA/PBST) (die für Western Blot-Analysen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper siehe Antikörperliste im Anhang). Die Membran wurde gewaschen (3x 10 min mit PBST) und daraufhin 1 h bei RT mit dem HRP-gekoppelten (*horse radish peroxidase*) Sekundärantikörper (in 3% BSA/PBST) inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x 10 min mit PBST) wurde die Membran 1 min mit Roti-Lumin1 (Roth) inkubiert und anschließend mit der Entwicklermaschine AGFA Curix 60 (Siemens AG, Erlangen, Deutschland) auf Amersham Hyperfilmen (GE Healthcare, Berlin, Deutschland) entwickelt.

### 3.3.6 Immunpräzipitation

#### 3.3.6.1 Immunpräzipitation mit magnetischen Microbeads

Für den Immunpräzipitationsversuch mit magnetischen *Microbeads* wurden PCI52\_PC-Zellen 16 h mit 100 ng rm Slit-2 inkubiert. Als Kontrolle wurden PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen ohne Slit-2-Behandlung verwendet. Mit Hilfe von RIPA-Puffer wurden anschließend Zelllysate hergestellt (siehe Kapitel 3.3.1). Diese wurden mit je 4 µg polyklonalem Ziege-anti-Robo-3-Antikörper und 100 µl magnetischen *Protein A/C Microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

30 min auf Eis inkubiert und daraufhin mit Hilfe von  $\mu$ MACS-Säulen (Miltenyi Biotec) aufgereinigt. Dazu wurden die Säulen nach dem Auftragen der mit den *Microbeads* inkubierten Zelllysate 4x mit 200  $\mu$ l RIPA-Puffer sowie 1x mit RIPA-Puffer (1:10 in Wasser verdünnt) gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 95°C heißem Roti-Load1 von den Säulen eluiert und als nächsten Schritt nochmals 5 min bei 95°C erhitzt. Mit Hilfe eines monoklonalen Maus-anti-P-Cadherin- bzw. polyklonalen Ziege-anti-Robo-3-Antikörpers wurde in Western Blot-Analysen (siehe Kapitel 3.3.3 bis 3.3.5) P-Cadherin bzw. Robo-3 nachgewiesen.

### **3.3.6.2 Immunpräzipitation mit Sepharose Protein A Beads**

Für den Immunpräzipitationsversuch mit *Sepharose Beads* wurden Zelllysate von PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (100  $\mu$ g) mit *Sepharose Protein A Beads* (Sigma) 2 h bei 4°C unter konstantem Rotieren gereinigt. Anschließend wurden die gewaschenen Zelllysate mit Kaninchen-anti-Snail-Antikörper (1:100) 4 h bei 4°C unter konstantem Rotieren präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 50  $\mu$ l *Sepharose Protein A Beads* 90 min bei 4°C unter konstantem Rotieren inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit RIPA-Puffer wurde der entstandene Komplex durch Zugabe von 95°C heißem Roti-Load1 von den *Beads* getrennt und die Proben wurden anschließend 5 min bei 95°C erhitzt. Mit Hilfe eines monoklonalen Kaninchen-anti-GSK3-beta- bzw. polyklonalen Kaninchen-anti-Snail-Antikörpers wurde in Western Blot-Analysen (siehe Kapitel 3.3.3 bis 3.3.5) GSK3-beta bzw. Snail nachgewiesen.

### **3.3.7 Protein-Dephosphorylierung mit Lambda-Proteinphosphatase**

Zelllysate von PCI52\_PC-Zellen (50  $\mu$ g) wurden mit *Lambda-Proteinphosphatase* (400 U) (New England BioLabs) 30 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von Roti-Load1 wurde die Reaktion gestoppt und die Zelllysate wurden daraufhin 5 min bei 95°C erhitzt. Mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-anti-Snail-Antikörpers wurde in Western Blot-Analysen (siehe Kapitel 3.3.3 bis 3.3.5) Snail nachgewiesen.

### **3.3.8 Gewebeschnitte**

Das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg stellte in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von gesunder, oraler Mukosa so-

wie OSCC-Gewebe von OSCC-Patienten für immunhistologische Färbungen zur Verfügung.

### **3.3.9 Immunhistochemie**

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von gesunder, oraler Mukosa bzw. OSCC wurden in Xylol (Roth) deparaffiniert und in einer Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Epitope 20 min mit 10 mM Natriumcitratpuffer (Merck) bei 99°C bzw. 6 min mit 0,05% Protease XXIV/PBS und 60 min mit 0,1% Hyaluronidase/Acetatpuffer (pH 6) bei 37°C demaskiert. Die Gewebeschnitte wurden daraufhin 10 min mit 3% Peroxidase/10% Methanol/PBS und 1 h mit 3% BSA/PBST blockiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (in 3% BSA/PBST) wurden die Gewebeschnitte 1 h mit dem Sekundärantikörper (in 3% BSA/PBST) bzw. 30 min mit *EnVision/HRP* (DakoCytomation) behandelt (verwendete Primär- und Sekundärantikörper siehe Antikörperliste im Anhang). Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit Diaminobenzidin (DAB) (DakoCytomation) inkubiert und die Zellkerne mit Hematoxilin (Roth) gefärbt.

### **3.3.10 Immunzytochemie**

Nach dem Aussäen der PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen auf Objektträgern (BD Falcon) wurden die Zellen 10 min mit 4% Paraformaldehyd/PBS (PFA) fixiert, 5 min mit 0,1% Triton-X 100/PBS (Sigma) permeabilisiert, 10 min mit 3% Peroxidase/10% Methanol/PBS und 1 h mit 5% Ziegenerum/PBST blockiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (in 5% Ziegenerum/PBST) wurden die Zellen 1 h mit dem Sekundärantikörper (in 5% Ziegenerum/PBST) bzw. 30 min mit *EnVision/HRP* inkubiert (verwendete Primär- und Sekundärantikörper siehe Antikörperliste im Anhang). Die Zellen wurden anschließend mit DAB inkubiert und die Zellkerne mit Hematoxilin gefärbt.

### **3.3.11 Immunfluoreszenz**

Nach dem Aussäen der Zellen auf Objektträgern wurden sie 10 min mit 4% PFA/PBS fixiert, 5 min mit 0,1% Triton-X 100/PBS permeabilisiert und 1 h mit 3% BSA/PBST blockiert. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (in 3% BSA/PBST)

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 h mit dem Sekundärantikörper (in 3% BSA/PBST) inkubiert (verwendete Primär- und Sekundärantikörper siehe Antikörperliste im Anhang). Die Zellkerne wurden daraufhin mit DAPI gefärbt und die Zellen wurden mit *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories, Peterborough, UK) eingedeckt.

### 3.3.12 Proximity Ligation Assay

Zur Detektion von Protein-Interaktionen wurde ein *Proximity Ligation Assay* (PLA) (Olink Bioscience, Uppsala, Schweden) verwendet. Mit dieser Methode können Protein-Interaktionen auf immunhistologische Weise detektiert und quantifiziert werden.

Nach dem Aussäen der Zellen auf Objektträgern wurden diese 10 min mit 4% PFA/PBS fixiert, 5 min mit 0,1% Triton-X 100/PBS permeabilisiert und mit 3% BSA/PBST 1 h bei 37°C blockiert. Daraufhin wurden die Zellen mit zwei Primärantikörpern (1:50 in 3% BSA/PBST) aus verschiedenen Spezies, die an den zu untersuchenden Proteinen binden, 1 h bei 37°C inkubiert (verwendete Antikörper siehe Antikörperliste im Anhang). Anschließend wurden die Zellen mit Spezies-spezifischen, Oligonukleotid-konjugierten Sekundärantikörpern (1:8 in 3% BSA/PBST) 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation der Zellen mit *Hybridization Solution* (*Hybridization Stock* 1:5 in Wasser, 15 min bei 37°C) und *Ligation Solution* (*Ligation Stock* 1:5 und *Ligase* 1:40 in Wasser, 15 min bei 37°C) ligierten die kurzen, benachbarten DNA-Stränge der Sekundärantikörper. Nach Zugabe der *Amplification Solution* (*Amplification Stock* 1:5 und *Polymerase* 1:80 in Wasser, 90 min bei 37°C) wurde der entstandene Oligonukleotidring in einer *rolling circle*-Amplifikation vervielfältigt. Komplementäre, fluoreszent-markierte Oligonukleotide der *Detection Solution* (*Detection Stock* 1:5 in Wasser, 1 h bei 37°C) binden an die Amplikons und erzeugen ein im Fluoreszenzmikroskop sichtbares, rot leuchtendes Signal. Am Ende des PLAs wurden die Zellen jeweils 2 min mit 2x Natriumcitratpuffer (*saline-sodium citrat buffer*, SSC), 1x SSC, 0,2x SSC, 0,02x SSC sowie 1 min mit 70% Ethanol gewaschen, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Zellen mit *Vectashield Mounting Medium* eingedeckt.

Um *in vivo* GSK3-beta/Snail- bzw. P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen nachzuweisen, wurden in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von gesunder, oraler Mukosa bzw.

OSCC deparaffiniert, rehydriert und mit Natriumcitratpuffer demaskiert (siehe Kapitel 3.3.9), bevor mit dem PLA-Versuch begonnen worden war.

Um den Effekt von Slit-2 auf die Ausbildung der P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen zu untersuchen, wurden die auf Objektträgern ausgesäten PCI52\_PC-Zellen vor dem PLA mit bzw. ohne 100 ng rm Slit-2 16 h bei 37°C inkubiert.

### 3.3.13 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

PCI52\_PC-Zellen wurden in eine 96-Well-Kulturplatte (BD Falcon) ausgesät und mit *function-blocking-P-cadherin* (fb-Pcad)-Antikörper (Thermo Scientific), der an den N-terminalen Teil von P-Cadherin bindet und dadurch die P-Cadherin-Funktion blockiert, bzw. mit einem unspezifischen IgG-Kontroll-Antikörper (Abcam, San Francisco, USA) 16 h bei 37°C inkubiert (1:10). Anschließend wurde die Slit-2-Konzentration im Zellmedium mit einem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (USCN Life Science, Wuhan, China) gemessen. Dazu wurden jeweils 100 µl des ÜS der behandelten PCI52\_PC-Zellen bzw. des Standards in die 96-Well-Platte aus dem ELISA-Kit pipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Entfernen des ÜS bzw. des Standards wurden die am Boden der 96-Well-Platte gebundenen Slit-2-Proteine mit 100 µl *Detection Reagent A* 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Entfernen des *Detection Reagent A* wurden die Proteine viermal mit 350 µl *Wash Solution* gewaschen und anschließend mit 100 µl *Detection Reagent B* 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen (5x) mit der *Wash Solution* wurden die Proteine in der 96-Well-Platte mit 90 µl *Substrate Solution* 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl *Stop Solution* wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

Um in den PCI52\_PC-Zellen die P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen nach Inkubation mit dem fb-Pcad-Antikörper bzw. mit einem unspezifischen IgG-Kontroll-Antikörper sichtbar zu machen, wurde nach der Inkubation mit den Antikörpern ein PLA durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.12).

### 3.3.14 Mikroskop

Für Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen wurde das Mikroskop Olympus BX 61 (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm *GraphPad Prism*. Für die Berechnung der Signifikanz von unabhängigen Gruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

## 4 Ergebnisse

### Teil I

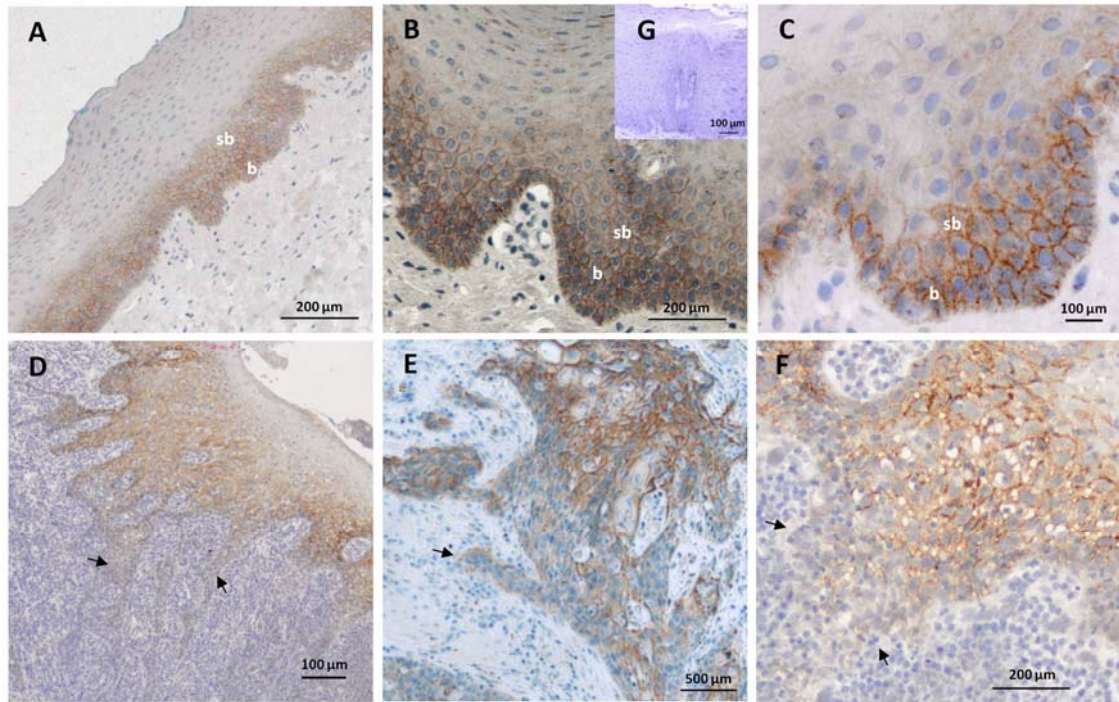
#### **P-Cadherin induziert in einer oralen, mesenchymalen Plattenepithelkarzinomzelllinie einen Epithel-ähnlichen Phänotyp**

Zahlreiche Studien belegen eine Korrelation zwischen dem Verlust der Cadherin-Expression und der Invasion und Metastasierung verschiedener Tumorarten (Cavallaro und Christofori, 2004). So ist im oralen Plattenepithelkarzinom neben dem Rückgang der E-Cadherin-Expression vor allem eine reduzierte P-Cadherin-Expression beobachtet worden (Williams *et al.*, 1998) (Munoz-Guerra *et al.*, 2005). Die aus dem Verlust der P-Cadherin-Expression resultierenden Veränderungen sollten daher im ersten Teil dieser Dissertation in einer oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie näher untersucht werden.

#### **4.1 Die Rolle von P-Cadherin in der OSCC-Zelllinie PCI52**

##### **4.1.1 Expression von P-Cadherin in der oralen Mukosa und im OSCC**

In der gesunden, oralen Mukosa wird P-Cadherin in den basalen und suprabasalen Zellschichten exprimiert (Abbildung 9A, B, C). Diese Lokalisation verändert sich jedoch im Laufe der OSCC-Progression. Während im Anfangsstadium des OSCC die P-Cadherin-Expression stark zunimmt (Abbildung 4B und Williams *et al.*, 1998), kann man im fortgeschrittenen OSCC an der Invasionsfront einen Verlust von membranständigem P-Cadherin und eine Zunahme von trunkiertem P-Cadherin im Zytoplasma beobachten (Abbildung 9D, E, F und Bauer *et al.*, 2008).



**Abbildung 9**

**Expression von P-Cadherin *in vivo*.**

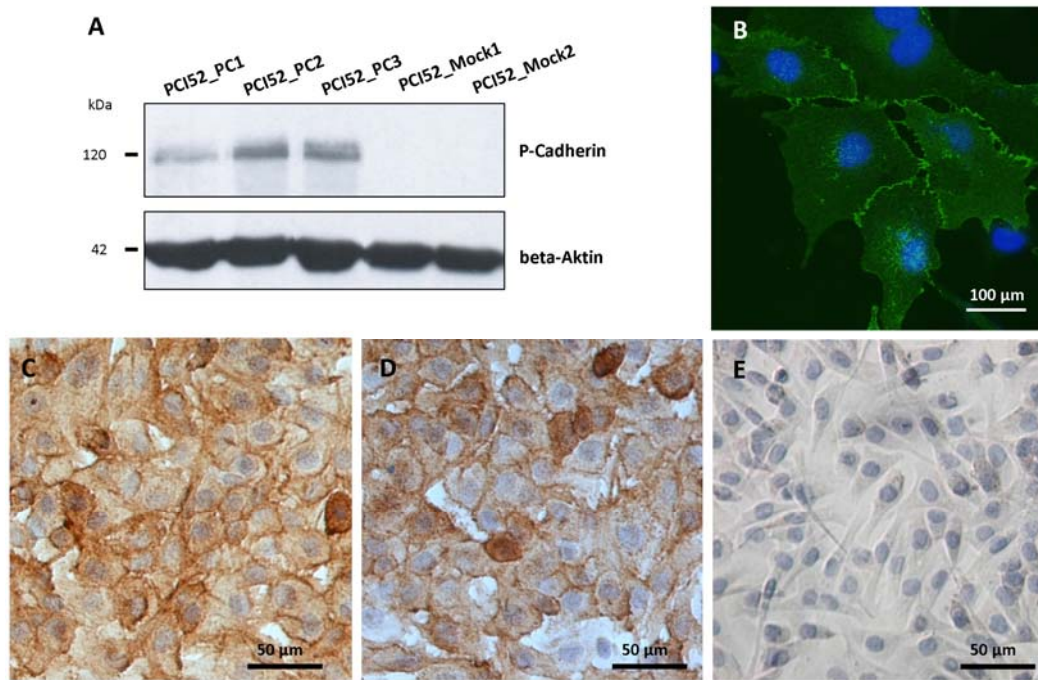
P-Cadherin-Expression in der oralen Mukosa (A, B, C) und im OSCC (D, E, F), Negativkontrolle orale Mukosa (G) (b = basal, sb = suprabasal, Pfeile = Invasionsfront des OSCC) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009 und Bauer *et al.*, 2011).

#### 4.1.2 Expression von P-Cadherin in der OSCC-Zelllinie PCI52

Um zu untersuchen, welche Rolle membrangebundenes P-Cadherin während der OSCC-Progression spielt, wurde die dedifferenzierte OSCC-Zelllinie PCI52, die selbst keine klassischen Cadherine (E-, N- und P-Cadherin) exprimiert, stabil mit P-Cadherin transfiziert.

Das von den generierten Zellklonen (PCI52\_PC1, PCI52\_PC2, PCI52\_PC3) exprimierte P-Cadherin (Abbildung 10A) wurde in die Zellmembran integriert (Abbildung 10B, C, D). Als Kontrolle dienten die mit einem Leervektor transfizierten PCI52-Zellen (PCI52\_Mock1, PCI52\_Mock2). Diese Zellen hingegen zeigten keine P-Cadherin-Expression (Abbildung 10A, E).





**Abbildung 10**

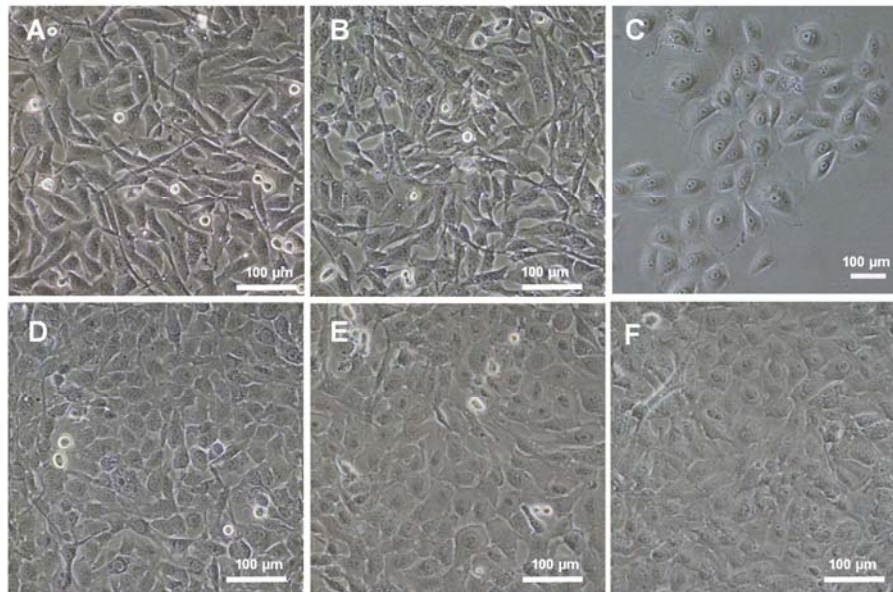
**Expression von P-Cadherin *in vitro*.**

P-Cadherin-Expression in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (A). P-Cadherin-Lokalisation in den PCI52\_PC- (B, C, D) und PCI52\_Mock-Zellen (E) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009).

#### 4.1.3 Einfluss von P-Cadherin auf die Zellmorphologie

Die PCI52-Zellen zeichneten sich durch eine dünne, spindelförmige Morphologie aus (Abbildung 11A, B). Aufgrund der induzierten P-Cadherin-Expression veränderte sich jedoch die Form dieser Zellen. Die P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen nahmen eine pflastersteinartige Zellmorphologie an (Abbildung 11D, E, F) und ähnelten dadurch der Morphologie von normalen Keratinozyten (Abbildung 11C).

Unter konfluenten Bedingungen zeichneten sich die PCI52\_PC-Zellen zusätzlich durch einen Wachstumsstopp aus. Im Gegensatz dazu hörten die PCI52\_Mock-Zellen selbst im konfluenten Zustand nicht auf, zu proliferieren.



**Abbildung 11**

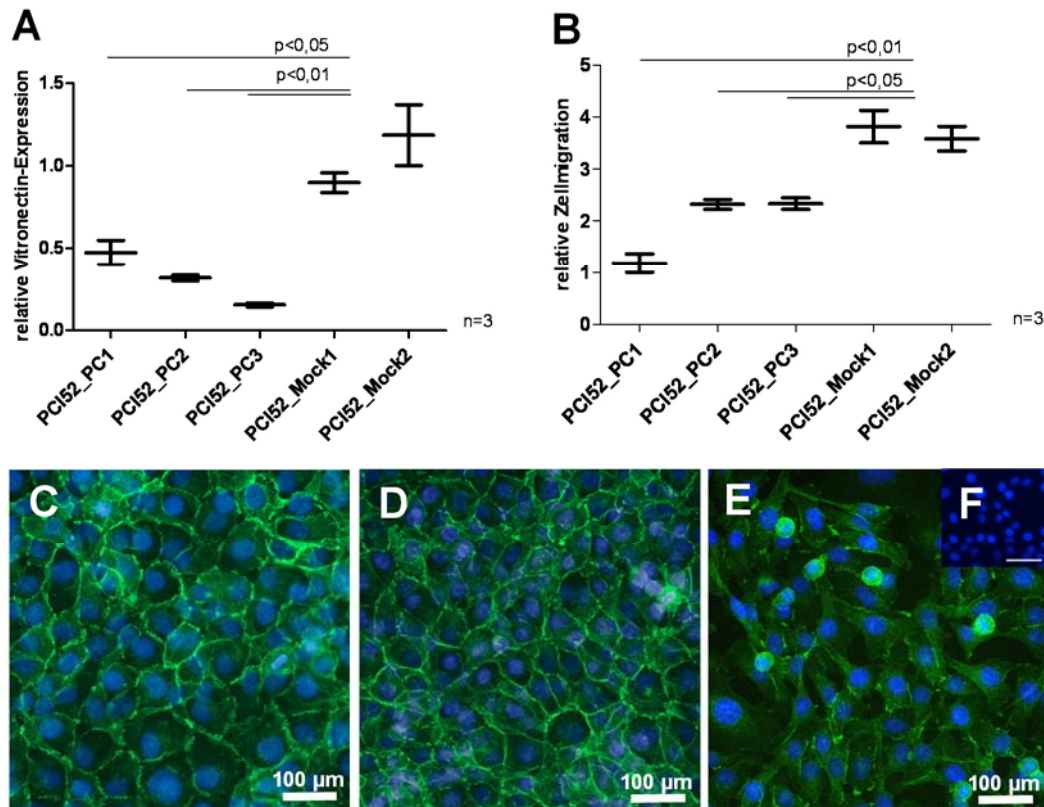
**Einfluss von P-Cadherin auf die Zellmorphologie.**

Zellmorphologie der PCI52\_Mock-Zellen (A, B), der HOKs (C) und der PCI52\_PC-Zellen (D, E, F) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009).

#### 4.1.4 Einfluss von P-Cadherin auf EMT-Marker sowie auf die Zellmigration

Um zu zeigen, dass sich die mesenchymalen, Cadherin-defizienten PCI52-Zellen durch die induzierte Expression von P-Cadherin in Richtung Epithelzellen verändert haben, wurde die Expression sowie die Lokalisation ausgewählter EMT-Marker untersucht.

Kennzeichen einer EMT sind die vermehrte Expression von mesenchymalen Markern, die reduzierte Expression von epithelialen Markern sowie eine veränderte Lokalisation von Transkriptionsfaktoren. Während der EMT nimmt außerdem die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix zu (Turley *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde Vitronectin, ein Zelladhäsionsmolekül der extrazellulären Matrix, als mesenchymaler Marker für qPCR-Analysen ausgewählt. Da die Transkriptionsfaktoren beta-Catenin und Snail beide in Verbindung mit Cadherinen stehen (beta-Catenin als Komponente des Cadherin/Catenin-Komplexes und Snail als Repressor von E-Cadherin), wurde die Lokalisation dieser beiden Transkriptionsfaktoren in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen analysiert. Zusätzlich wurde in funktionellen Experimenten die Auswirkung der P-Cadherin-Expression auf die Migration der PCI52-Zellen untersucht.

**Abbildung 12****Einfluss von P-Cadherin auf EMT-Marker sowie auf die Zellmigration.**

Expression des mesenchymalen Markers Vitronectin in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (A). Zellmigration der PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (B). Lokalisation von beta-Catenin in den PCI52\_PC- (C, D) und PCI52\_Mock-Zellen (E), Negativkontrolle PCI52\_PC-Zellen (F) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009).

Expressionsanalysen des mesenchymalen Markers Vitronectin ergaben eine signifikant reduzierte Vitronectin-Expression in den PCI52\_PC-Zellen im Vergleich zu den PCI52\_Mock-Zellen (Abbildung 12A).

Darüber hinaus zeigten sich auch in der Zellmigration Unterschiede zwischen PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen. In Boydenkammer-Migrationsexperimenten wanderten die P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen signifikant langsamer als die Kontrollzellen durch eine poröse Membran (Porengröße 8  $\mu\text{m}$ ) auf einen chemotaktischen Lockstoff zu (Abbildung 12B).

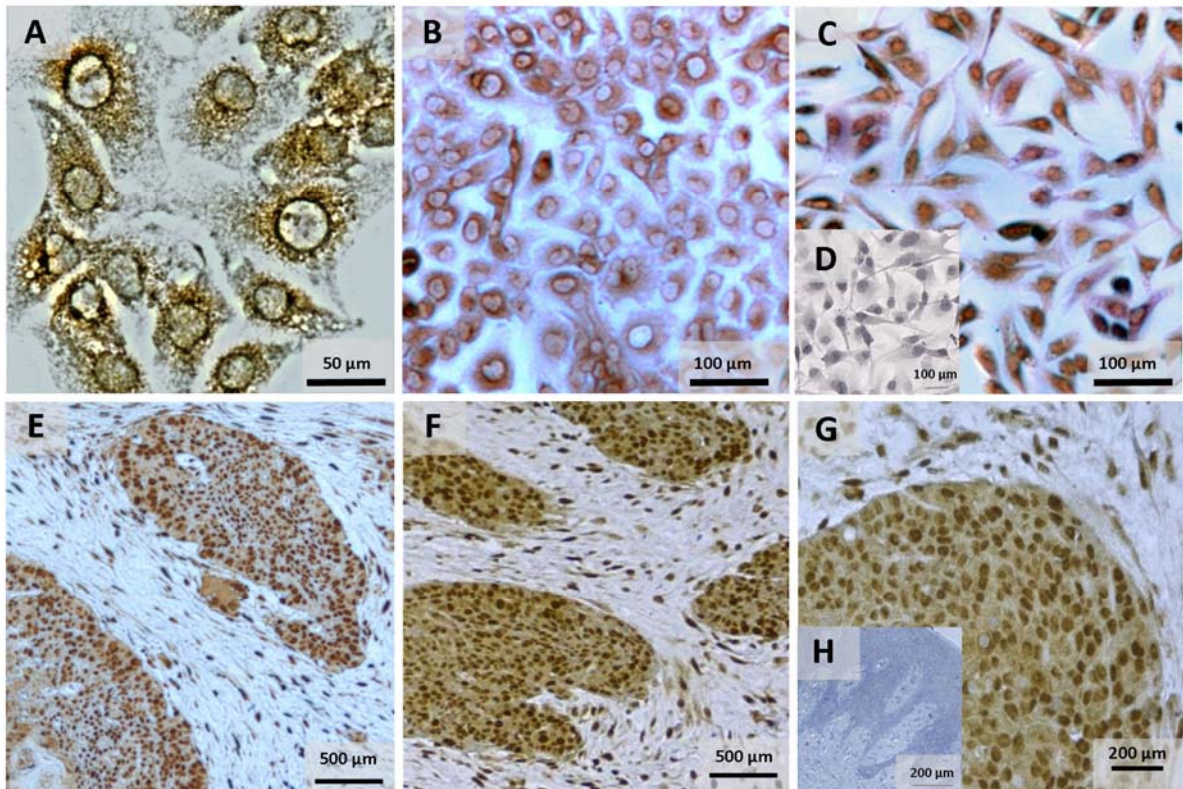
Ein weiterer Beweis, dass sich die P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen in Zellen mit epithelialen Merkmalen verwandelt haben, ist die veränderte Lokalisation von beta-Catenin. In den PCI52\_Mock-Zellen findet man beta-Catenin im Zytoplasma und im Kern der Zellen (Abbildung 12E), während man es in den PCI52\_PC-Zellen an der Zellmembran beobachten kann (Abbildung 12C, D).



## 4.2 Die Rolle von Snail in der OSCC-Zelllinie PCI52

### 4.2.1 Expression von Snail im OSCC sowie in der OSCC-Zelllinie PCI52

Da die durch die P-Cadherin-Expression hervorgerufene Veränderung der Zellmorphologie auf eine Reversion der EMT hinwies, wurde die Expression und Lokalisation von Snail, einem weiteren EMT-Marker (Cano *et al.*, 2000), *in vitro* und *in vivo* untersucht.



**Abbildung 13**

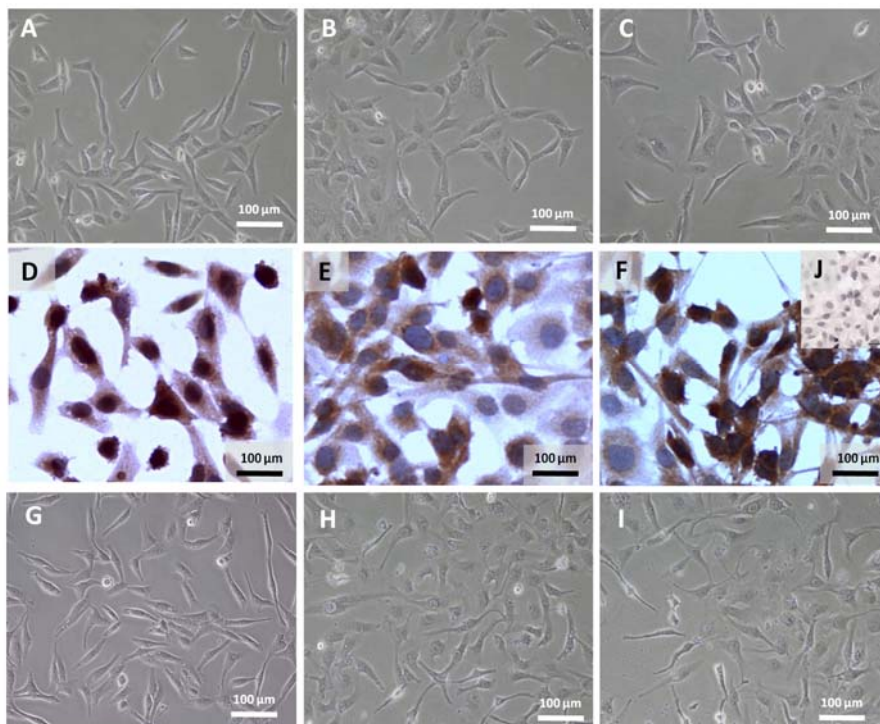
**Expression von Snail *in vitro* und *in vivo*.**

Snail-Expression in den PCI52\_PC- (A, B) und PCI52\_Mock-Zellen (C), PCI52\_Mocks (D) sowie im OSCC (E, F, G), Negativkontrolle PCI52\_Mock-Zellen (D) und OSCC (H) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009).

Histologische Färbungen zeigten, dass Snail in den PCI52\_PC-Zellen im Zytoplasma rund um den Zellkern lokalisiert war (Abbildung 13A, B). Im Gegensatz dazu konnte man in den PCI52\_Mock-Zellen eine starke Kern- und gleichzeitig keine zytoplasmatische Snail-Färbung beobachten (Abbildung 13C). *In vivo* zeigte sich Snail im fortgeschrittenen OSCC ebenfalls nur im Zellkern (Abbildung 13E, F, G).

#### 4.2.2 Einfluss des P-Cadherin- bzw. Snail-Knockdowns auf die Zellmorphologie sowie auf die Snail-Lokalisation

Um zu beweisen, dass die beobachteten Effekte (Änderung der Zellmorphologie und unterschiedliche Snail-Lokalisation) durch P-Cadherin induziert worden waren, wurde die P-Cadherin-Expression der PCI52\_PC-Zellen durch *antisense*-P-Cadherin-Transfektion (as-Pcad) vermindert. Zellklone, die mit as-Pcad transient transfiziert worden waren (Abbildung 14B, C), gewannen die ursprüngliche, spindelförmige Morphologie von PCI52-Zellen (Abbildung 14A) wieder zurück.



**Abbildung 14**

**Einfluss des P-Cadherin- bzw. Snail-Knockdowns auf die Zellmorphologie sowie auf die Snail-Lokalisation.**

Zellmorphologie der PCI52\_Mock- (A) und der mit as-Pcad transfizierten PCI52\_PC-Zellen (B, C). Snail-Lokalisation in den PCI52\_Mock- (D) und in den mit as-Pcad transfizierten PCI52\_PC-Zellen (E, F). Zellmorphologie der PCI52\_Mock- (G) und der mit as-Snail transfizierten PCI52\_Mock-Zellen (H, I), Negativkontrolle PCI52\_Mock-Zellen (J) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009).

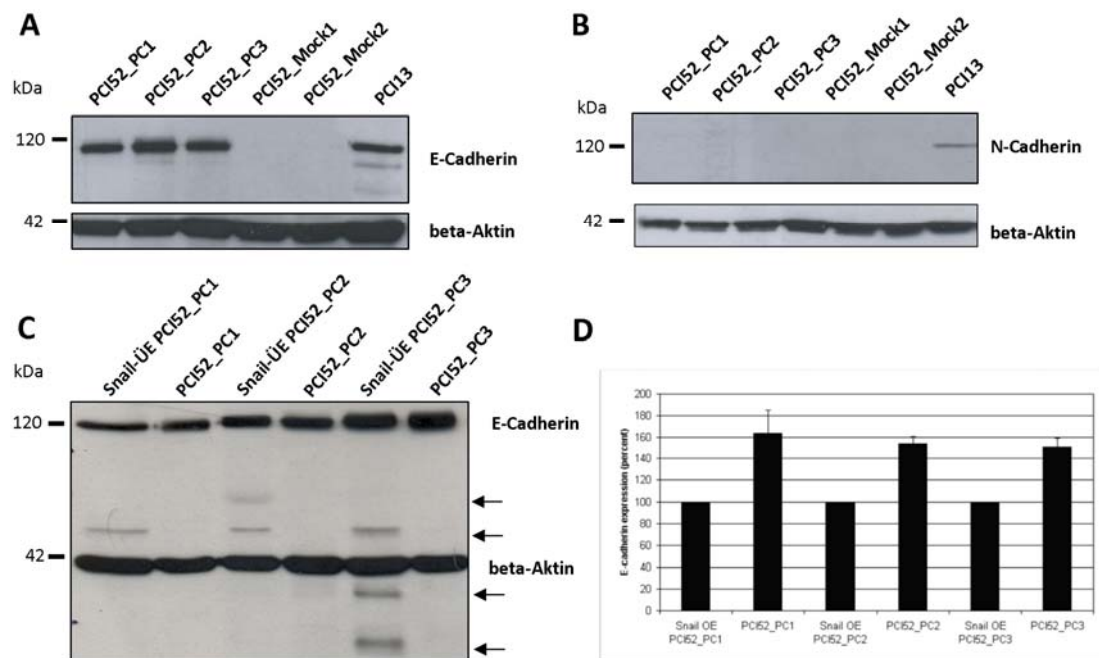
Auch den Transkriptionsfaktor Snail, der sich in den PCI52\_PC-Zellen im Zytoplasma befand (Abbildung 13A, B), konnte man in den PCI52\_PC-Zellen mit transientem P-Cadherin-Knockdown wie in den PCI52\_Mock-Zellen (Abbildung 14D) wieder im Zellkern beobachten (Abbildung 14E, F).

Zusätzlich wurden, um die Effekte von Snail auf die P-Cadherin-defizienten PCI52-Zellen zu untersuchen, PCI52\_Mock-Zellen mit *antisense*-Snail (as-Snail) transfiziert.

Dieser transiente Knockdown von Snail bewirkte in den spindelförmigen PCI52\_Mock-Zellen (Abbildung 14G) zum Teil eine Änderung der Zellform hin zu einem pflastersteinartigen Aussehen (Abbildung 14H, I).

### 4.2.3 Einfluss von Snail auf die E-Cadherin-Expression

Im Zellkern fungiert der EMT-Marker Snail als Transkriptionsfaktor und reprimiert die Expression von E-Cadherin (Cano *et al.*, 2000). Daher wurde aufgrund der unterschiedlichen Snail-Lokalisation in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen die E-Cadherin-Expression in diesen Zelllinien untersucht.



**Abbildung 15**  
**Einfluss von Snail auf die E- bzw. N-Cadherin-Expression.**

Re-Expression von E-Cadherin in den PCI52\_PC-Zellen aufgrund von Snail-Translokation (A). Keine Veränderung der N-Cadherin-Expression in den PCI52-Zellen aufgrund von Snail-Translokation (B). Abnahme der E-Cadherin-Expression sowie das Auftreten von E-Cadherin-Trunkierungen in den mit einem ÜE-Snail-Vektor transfizierten PCI52\_PC-Zellen (C). Densitometrische Auswertung der E-Cadherin-Expression in den PCI52\_PC- und den mit einem ÜE-Snail-Vektor transfizierten PCI52\_PC-Zellen (D) (ÜE bzw. OE = Überexpression, Pfeile = E-Cadherin-Trunkierungen) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009).

Da in den P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen eine zytoplasmatische Translokation des Repressors Snail erfolgte (Abbildung 13A, B), kam es in diesen Zellen zu einer Expression von E-Cadherin (Abbildung 15A). Im Gegensatz dazu reprimierte

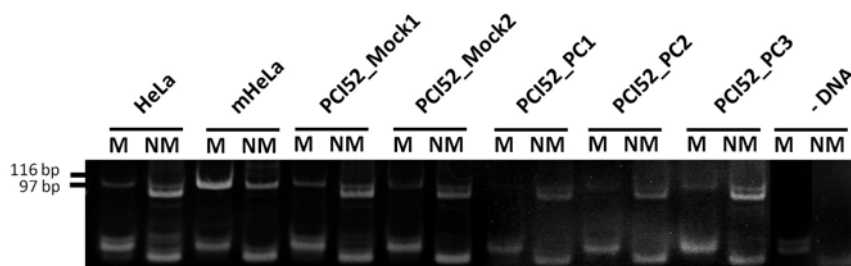
nukleäres Snail der Mockkontrollen (Abbildung 13C) die Expression von E-Cadherin (Abbildung 15A).

Die unterschiedliche Snail-Lokalisation in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression von N-Cadherin (Abbildung 15B).

Um zu beweisen, dass Snail die E-Cadherin-Expression in den transfizierten PCI52-Zellen beeinflusst, wurde dieser Transkriptionsfaktor in den PCI52\_PC-Zellen, deren Snail sich nur im Zytoplasma befand (Abbildung 13A, B), überexprimiert. Nach Snail-Überexpression zeigten Western Blot-Analysen und die dazugehörige densitometrische Auswertung eine Abnahme der E-Cadherin-Expression infolge der Snail-Überexpression auf Proteinebene (Abbildung 15C, D). Gleichzeitig konnte man in den Western Blot-Analysen nur in den Snail überexprimierenden PCI52\_PC-Zellen zusätzliche Banden beobachten, die auf Trunkierungen von E-Cadherin hinwiesen (Abbildung 15C).

#### 4.2.4 Untersuchung des E-Cadherin-Promotors

Die Methylierung von Cytosinen in CpG-Inseln von Promotor-Regionen führt zur Inaktivierung zahlreicher Gene (Baylin *et al.*, 1998) (Costello *et al.*, 2000). Neben Snail, dem Repressor von E-Cadherin, können somit auch Hypermethylierungen im E-Cadherin-Promotor einen Verlust der E-Cadherin-Expression verursachen (Takeno *et al.*, 2004) (Sou *et al.*, 2010).



**Abbildung 16**

**Analyse des Methylierungsstatus im E-Cadherin-Promotor der PCI52\_PC- (Spuren 9-14) und PCI52\_Mock-Zellen (Spuren 5-8).**

Als Kontrolle für die MSP diente gDNA aus der Kontrollzelllinie HeLa (Spuren 1-2, keine Promotormethylierung) bzw. gDNA aus der Kontrollzelllinie HeLa (mHeLa), die enzymatisch mit CpG-Methylase methyliert worden war (Spuren 3-4, Promotormethylierung). Größe der Amplifikationsfragmente: 116 bp (methyliertes *Template*) und 97 bp (nicht-methyliertes *Template*). Die unterste DNA-Bande zeigt Primer-Dimere (aus Bauer *et al.*, 2009).

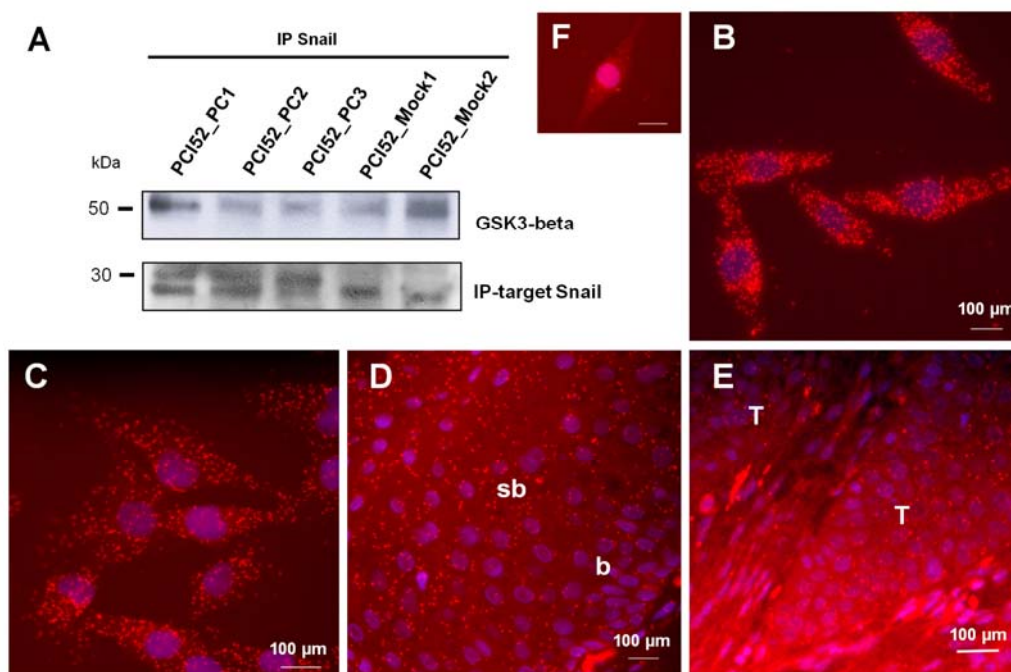


Um zu bestätigen, dass die Re-Expression von E-Cadherin in den PCI52\_PC-Zellen durch die Translokation von Snail und nicht durch Veränderungen des Methylierungsstatus am E-Cadherin-Promotor zustande kam, wurde dieser in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass in keiner Zelllinie der E-Cadherin-Promotor methyliert war (Abbildung 16, Spuren 5-14).

### 4.3 Die Rolle von GSK3-beta in der OSCC-Zelllinie PCI52

#### 4.3.1 Nachweis der GSK3-beta/Snail-Interaktion

Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Serin/Threonin-Kinase GSK3-beta nukleäres Snail phosphoryliert und auf diese Weise für den Transport von Snail aus dem Zellkern ins Zytoplasma verantwortlich ist (Schlessinger und Hall, 2004), wurde untersucht, ob GSK3-beta auch in den transfizierten PCI52-Zellen an dieser Aktion beteiligt ist. Mit Hilfe von Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass sowohl in den PCI52\_PC- als auch in den PCI52\_Mock-Zellen GSK3-beta mit Snail interagiert (Abbildung 17A).



**Abbildung 17**

**Nachweis der GSK3-beta/Snail-Interaktion *in vitro* und *in vivo*.**

Nachweis der GSK3-beta/Snail-Interaktion mittels Immunpräzipitation in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (A). Nachweis der GSK3-beta/Snail-Interaktion mittels PLA *in vitro* in den PCI52\_PC- (B) und PCI52\_Mock-Zellen (C). Nachweis der GSK3-beta/Snail-Interaktion *in vivo* in

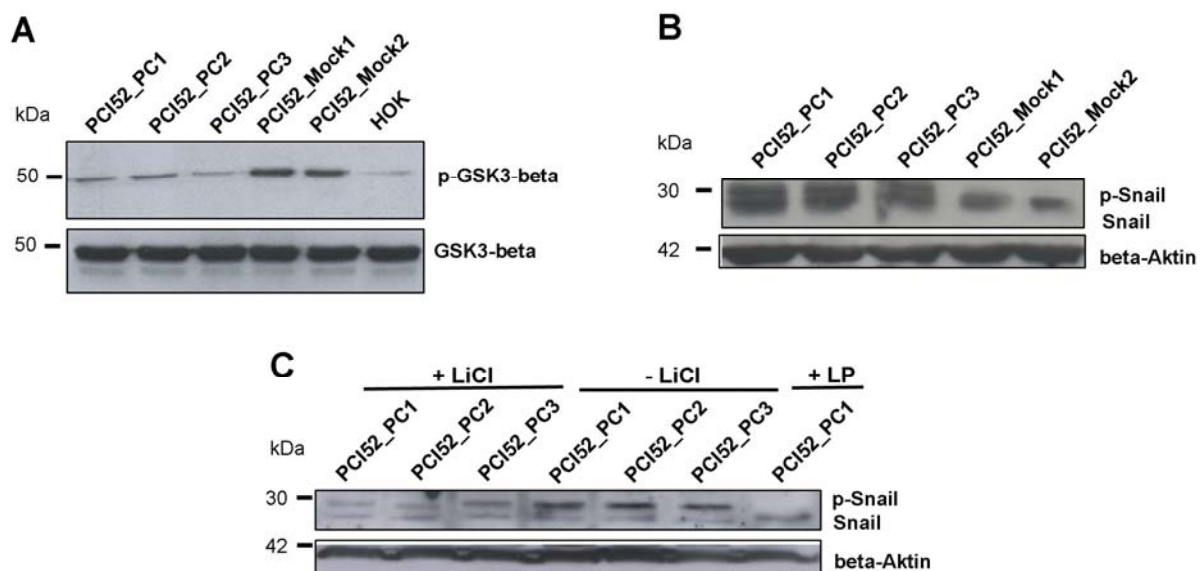


gesunder, oraler Mukosa (**D**) und im OSCC (**E**), Negativkontrolle PCI52\_Mock-Zellen (**F**) (b = basal, sb = suprabasal, T = Tumor) (verändert nach Bauer *et al.*, 2009).

Mit Hilfe von PLAs wurde die GSK3-beta/Snail-Interaktion in beiden Zelllinien auf immunhistologische Weise bestätigt (Abbildung 17B, C). Auch *in vivo* konnten Interaktionen zwischen GSK3-beta und Snail sowohl in der gesunden, oralen Mukosa (Abbildung 17D) als auch im OSCC nachgewiesen werden (Abbildung 17 E).

#### 4.3.2 Einfluss der GSK3-beta-Aktivität auf die Snail-Phosphorylierung

Da der Expressionsstatus von GSK3-beta sowohl in den PCI52\_PC- als auch in den PCI52\_Mock-Zellen gleich ist (Abbildung 18A), wurde der Aktivitätszustand dieser Kinase in beiden Zelllinien anhand der Serin-9-Phosphorylierung überprüft. Interessanterweise konnte in den PCI52\_PC-Zellen und in den HOKs im Vergleich zu den PCI52\_Mock-Zellen signifikant weniger an Serin-9 phosphoryliertes GSK3-beta detektiert werden (Abbildung 18A). Dieses Ergebnis bedeutet, dass die P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen mehr von der aktiven GSK3-beta besitzen als die Kontrollzellen.



**Abbildung 18**

#### **Einfluss von GSK3-beta auf die Snail-Phosphorylierung.**

Unterschiedlicher GSK3-beta-Aktivitätszustand in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (**A**). Unterschiedlicher Phosphorylierungszustand von Snail in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (**B**). Veränderung der Snail-Phosphorylierung durch Hemmung der GSK3-beta mittels LiCl bzw. durch *Lambda*-Proteinphosphatase-Behandlung (**C**) (p-GSK3-beta = phosphoryliertes GSK3-beta [inaktiv], p-Snail = phosphoryliertes Snail, LP = *Lambda*-Proteinphosphatase) (aus Bauer *et al.*, 2009).

Als Konsequenz dieser vermehrt aktiven Kinase erwarteten wir eine Phosphorylierung von Snail in den PCI52\_PC-Zellen. Tatsächlich zeigten sich in Western Blot-Analysen der PCI52\_PC-Zellen im Gegensatz zu den PCI52\_Mock-Zellen zwei Snail-Banden (Abbildung 18B), welche auf Snail und phosphoryliertes Snail hinwiesen. Um zu bestätigen, dass es sich bei der langsamer wandernden Bande (Abbildung 18B, obere Bande in den Spuren 1-3) um phosphoryliertes Snail handelte, wurden die Zelllysate der PCI52\_PC-Zellen mit *Lambda*-Proteinphosphatase behandelt. Nach dieser Phosphatase-Behandlung verschwand die obere Snail-Bande (Abbildung 18C, letzte Spur), was bedeutet, dass es sich um phosphoryliertes Snail gehandelt hatte.

Um zu demonstrieren, dass GSK3-beta für die Snail-Phosphorylierung in den P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen verantwortlich war, wurden diese Zellen zur Inhibierung der GSK3-beta-Aktivität mit LiCl behandelt. Nach der Blockierung der GSK3-beta-Aktivität nahm die Snail-Phosphorylierung in den PCI52\_PC-Zellen (Abbildung 18C, Spuren 1-3) im Vergleich zu den PCI52\_PC-Zellen ohne LiCl-Behandlung (Abbildung 18C, Spuren 4-6) deutlich ab.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Snail in den P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen verstärkt von einer aktiven GSK3-beta phosphoryliert wird. Dieses markierte Snail wird daraufhin vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort möglicherweise im Proteasom degradiert.

## 4.4 Zusammenfassung Teil I

In diesem Teil der Dissertation wurde in einer Cadherin-defizienten OSCC-Zelllinie die Expression von P-Cadherin induziert. Diese induzierte P-Cadherin-Expression führte zu einer reduzierten Migrationsfähigkeit der OSCC-Zellen. Weiterhin veränderten sich aufgrund der induzierten P-Cadherin-Expression die Morphologie der OSCC-Zellen sowie die Expression bzw. die Lokalisation von EMT-Markern. So nahm die Expression des mesenchymalen Markers Vitronectin in den P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen ab. Die Expression von P-Cadherin führte außerdem in den OSCC-Zellen zu einer Translokation von zytoplasmatischem beta-Catenin an die Zellmembran. Desweiteren bewirkte die P-Cadherin-Expression die zytoplasmatische Translokation des mesenchymalen Transkriptionsfaktors Snail, in Folge dessen die Re-Expression von E-Cadherin in diesen OSCC-Zellen induziert wurde.

## **Teil II**

### **P-Cadherin reguliert in Verbindung mit dem Slit/Robo-Signalweg die Migration einer oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie**

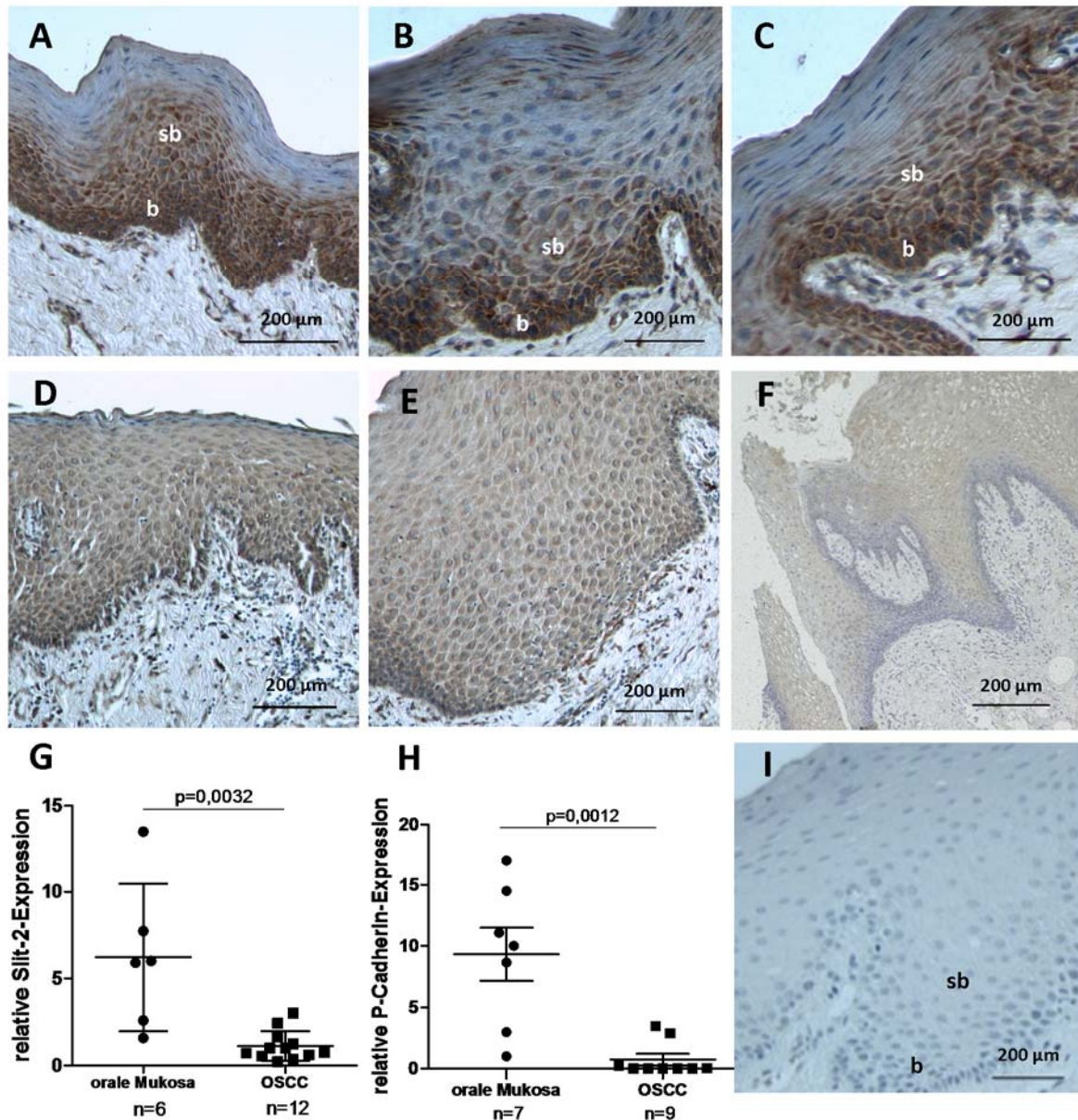
Aktuelle Literatur beschreibt eine Verbindung zwischen Cadherinen, dem Wnt- und dem Slit/Robo-Signalweg (Rhee *et al.*, 2002) (Rhee *et al.*, 2007) (Santiago-Martinez *et al.*, 2008) (Shiau und Bronner-Fraser, 2009) (Tseng *et al.*, 2010) (Prasad *et al.*, 2008). Die Verbindung zwischen P-Cadherin und dem Wnt-Signalweg ist bereits im ersten Teil dieser Dissertation in oralen Plattenepithelkarzinomzellen eingehend analysiert worden. In deren zweiten Teil sollte daher, ausgehend von diesen Ergebnissen, die Verbindung zwischen P-Cadherin und dem Slit/Robo-Signalweg untersucht werden.

#### **4.5 Die Rolle von Slit-2 in der OSCC-Zelllinie PCI52**

##### **4.5.1 Expression von Slit-2 in der oralen Mukosa und im OSCC**

In der gesunden, oralen Mukosa wird Slit-2 in den basalen und suprabasalen Zellschichten exprimiert (Abbildung 19A, B, C). Im Anfangsstadium des OSCC nimmt jedoch die starke Slit-2-Expression in diesen Zellschichten ab (Abbildung 19D, E), bis man im fortgeschrittenen OSCC nur noch eine diffuse Slit-2-Färbung finden kann (Abbildung 19F). Auch die P-Cadherin-Expression verändert sich während der Progression des OSCC. In der gesunden, oralen Mukosa wird P-Cadherin, genau wie Slit-2, ebenfalls nur in den basalen und suprabasalen Zellschichten exprimiert (Abbildung 9A, B, C). Während wir im Anfangsstadium des OSCC eine starke Erhöhung der P-Cadherin-Expression beobachteten, kann man im fortgeschrittenen OSCC an der Invasionsfront einen Verlust von membranständigem P-Cadherin und eine Zunahme von trunkiertem P-Cadherin im Zytoplasma beobachten (Abbildung 9D, E, F und Bauer *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Korrelation und wegen der aus der Literatur bekannten Cadherin/Slit/Robo-Verbindung (Rhee *et al.*, 2002) (Shiau und Bronner-Fraser, 2009) kann man vermuten, dass P-Cadherin im oralen Epithel mit dem Slit/Robo-Signalweg verbunden ist.

Quantitative PCR-Analysen von mRNA, die aus Gefrierschnitten von OSCC- und Kontroll-Patienten isoliert wurde, bestätigten den aus den immunhistologischen Färbungen beobachteten Rückgang der Slit-2- und P-Cadherin-Expression. Die Abbildung 19G und H zeigen, dass sowohl die Slit-2- als auch die P-Cadherin-mRNA im OSCC im Vergleich zur mRNA aus gesunder, oraler Mukosa signifikant abnimmt.



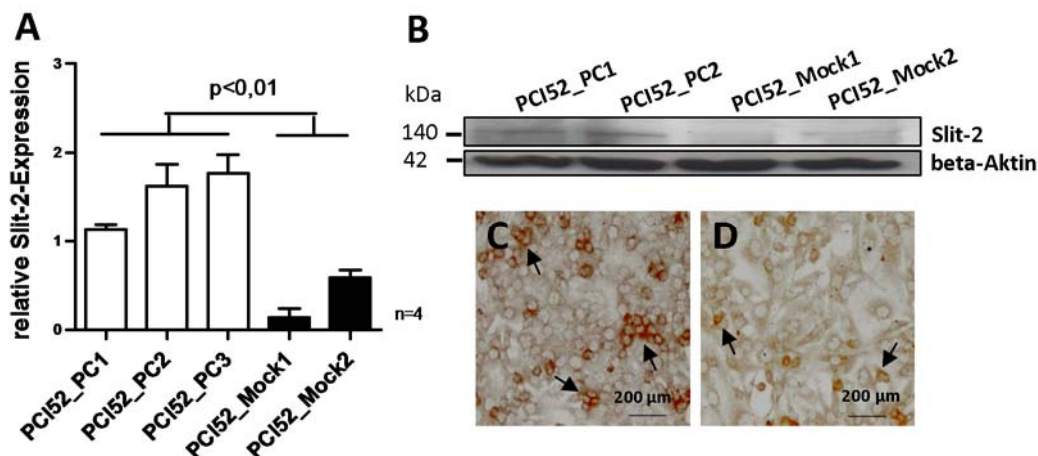
**Abbildung 19**

**Expression von Slit-2 *in vivo*.**

Slit-2-Expression in der oralen Mukosa (A, B, C) und im OSCC (D, E, F). Analyse der Slit-2- (G) und der P-Cadherin-Expression (H) auf mRNA-Ebene in OSCC- und in Kontroll-Patienten, Negativkontrolle orale Mukosa (I) (b = basal, sb = suprabasal) (verändert nach Bauer *et al.*, 2011).

#### 4.5.2 Expression von Slit-2 in der OSCC-Zelllinie PCI52

Da sowohl die *in vivo*-Färbungen (Abbildung 19A, B, C, Abbildung 9A, B, C) als auch die qPCR-Ergebnisse (Abbildung 19G, H) einen möglichen Zusammenhang zwischen P-Cadherin und Slit-2 erkennen ließen, wurde die Slit-2-Expression in der mit P-Cadherin bzw. mit einem Leervektor transfizierten OSCC-Zelllinie PCI52 analysiert. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen der P-Cadherin- und der Slit-2-Expression. Die PCI52\_PC-Zellen exprimierten signifikant mehr Slit-2 als die Kontrollzellen (Abbildung 20A). Auch auf Protein-Ebene konnte in den P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen mehr Slit-2 nachgewiesen werden als in den PCI52\_Mock-Zellen (Abbildung 20B). Immunzytologische Färbungen bestätigten darüber hinaus die stärkere Slit-2-Expression in den PCI52\_PC-Zellen gegenüber den PCI52\_Mock-Zellen. Während man in konfluenten PCI52\_PC-Zellen Slit-2 perizellulär in vielen Zell-Patches fand (Abbildung 20C, Pfeile), zeigten in den PCI52\_Mock-Zellen nur wenige Zellen eine Slit-2-Färbung (Abbildung 20D, Pfeile).



**Abbildung 20**

##### Expression von Slit-2 *in vitro*.

Analyse der Slit-2-Expression in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen auf mRNA-Ebene (**A**). Analyse der Slit-2-Expression in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen auf Protein-Ebene (**B**). Slit-2-Lokalisation in den PCI52\_PC- (**C**, Pfeile) und PCI52\_Mock-Zellen (**D**, Pfeile) (aus Bauer *et al.*, 2011).

In weiteren qPCR-Analysen wurde die Expression der übrigen Mitglieder der Slit-Familie auf eine Korrelation mit der P-Cadherin-Expression hin untersucht. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der P-Cadherin- und der Slit-1- (Abbildung 21A) bzw. Slit-3-Expression (Abbildung 21B) beobachtet werden.

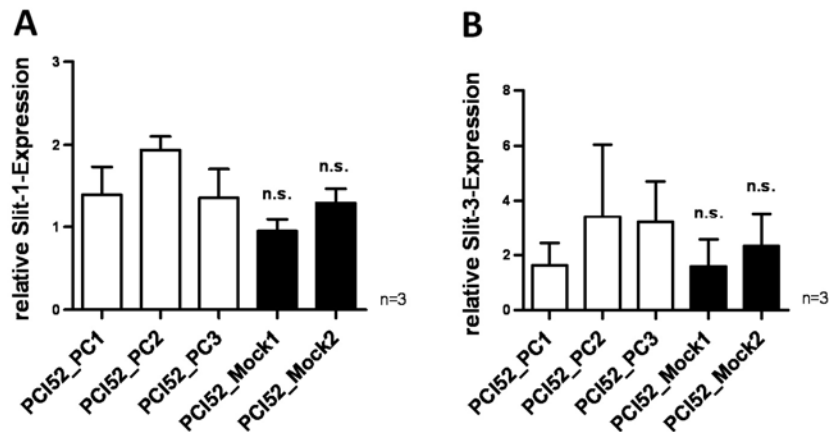


Abbildung 21

Expression von Slit-1 (A) bzw. Slit-3 (B) in PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (aus Bauer *et al.*, 2011).

#### 4.5.3 Einfluss von P-Cadherin auf die Slit-2-Sekretion

Um eine direkte Verbindung zwischen Slit-2 und P-Cadherin herzustellen, wurde in den P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen die Funktion von P-Cadherin mit einem Antikörper blockiert und anschließend die Änderung der Slit-2-Konzentration im Zellmedium mit einem ELISA gemessen. Der verwendete, funktionsblockierende P-Cadherin (fb-Pcad)-Antikörper inhibiert die Funktion von P-Cadherin, indem er an den extrazellulären, N-terminalen Teil von P-Cadherin bindet, führt aber nicht zu einem Ablösen der Zellen von der Zellkulturplatte. Abbildung 22 zeigt, dass die PCI52\_PC-Zellen, deren P-Cadherin blockiert worden war, signifikant weniger Slit-2 sezernierten als die PCI52\_PC-Zellen, die mit einem unspezifischen IgG-Kontroll-Antikörper behandelt worden waren.

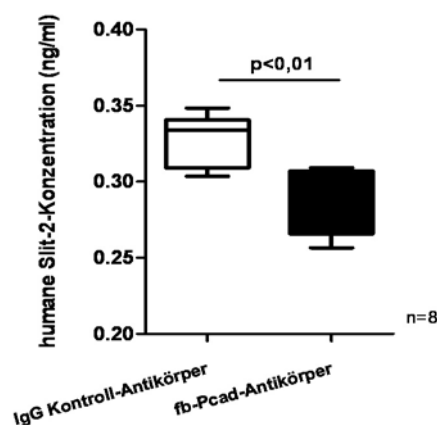


Abbildung 22

#### Einfluss von P-Cadherin auf die Slit-2-Sekretion.

Slit-2-Sekretion von PCI52\_PC-Zellen vor und nach der Inhibierung der P-Cadherin-Funktion mit einem funktionsblockierenden P-Cadherin-Antikörper (aus Bauer *et al.*, 2011).

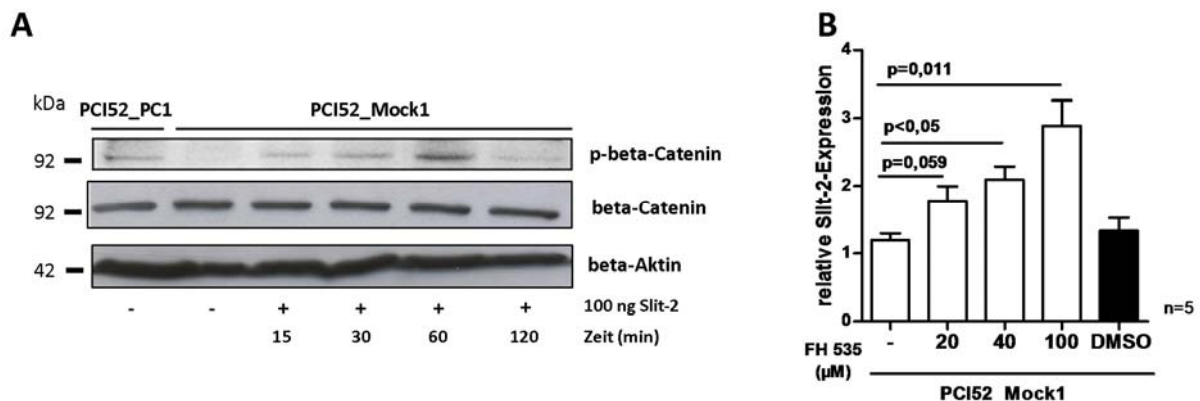


#### 4.5.4 Einfluss von Slit-2 auf den Wnt-Signalweg

Bei der Suche nach Signalwegen, die P-Cadherin mit der Slit-2-Expression in Verbindung bringen, wurde der Wnt-verwandte GSK3-beta-Signalweg untersucht.

Im Ergebnisteil I wurde gezeigt, dass GSK3-beta in den PCI52\_PC-Zellen im Gegensatz zu den PCI52\_Mock-Zellen vermehrt aktiv ist (Abbildung 18A). Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Zelllinien ist die differente Lokalisation von beta-Catenin. Während beta-Catenin in den PCI52\_PC-Zellen an der Zellmembran lokalisiert war (Abbildung 12C, D), befand sich in den PCI52\_Mock-Zellen beta-Catenin im Zytoplasma und im Zellkern (Abbildung 12E).

Wie sich nun Slit-2 und der Wnt-verwandte GSK3-beta-Signalweg gegenseitig beeinflussen, zeigt Abbildung 23. Wurden die PCI52\_Mock-Zellen mit Slit-2 inkubiert, so wurde das zytoplasmatische beta-Catenin dieser Kontrollzellen innerhalb einer Stunde transient phosphoryliert (Abbildung 23A). Diese Phosphorylierung von beta-Catenin deutet auf eine Beeinflussung des Wnt-Signalwegs durch Slit-2 hin. Eine längere Behandlung mit Slit-2 führte jedoch wieder zu einer Abnahme der beta-Catenin-Phosphorylierung (Abbildung 23A).



**Abbildung 23**

##### Einfluss von Slit-2 auf den Wnt-Signalweg.

Slit-2-induzierte Phosphorylierung von beta-Catenin in den PCI52\_Mock-Zellen (**A**). Zunahme der Slit-2-Expression durch Inhibierung des beta-Catenin/Lef/Tcf-Komplexes mit FH 535 in den PCI52\_Mock-Zellen (**B**) (p-beta-Catenin = phosphoryliertes beta-Catenin) (aus Bauer *et al.*, 2011).

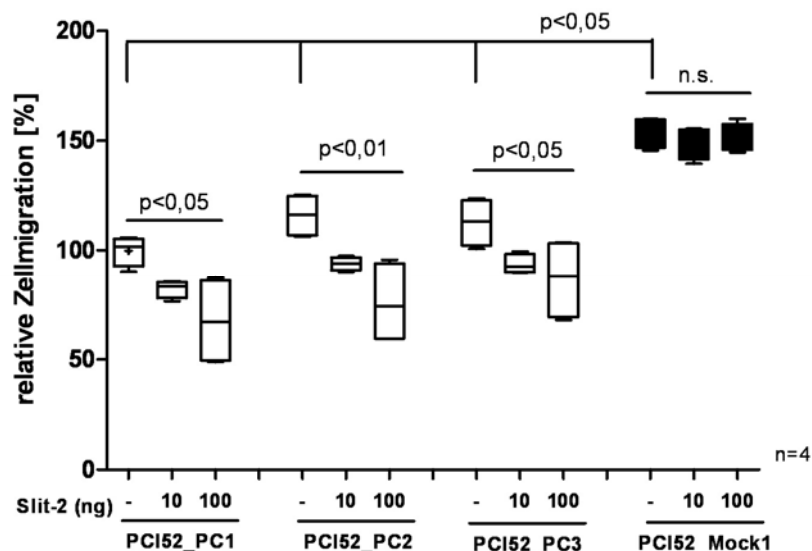
Auf der anderen Seite ist auch beta-Catenin an der Slit-2-Expression beteiligt. Wurde die Bindung von beta-Catenin an den Lef/Tcf-Komplex mit dem FH 535-Inhibitor inhibiert, kam es zu einer Dosis-abhängigen Zunahme der Slit-2-mRNA-Expression in den PCI52\_Mock-Zellen (Abbildung 23B). Normalerweise würde man nach Inhibierung des beta-Catenin/Lef/Tcf-Komplexes eine verminderte Genexpression er-

warten. Da aber Abbildung 23B einen Anstieg der Slit-2-Expression nach Inhibierung des Transkriptionsfaktors beta-Catenin zeigt, bedeutet dies, dass neben beta-Catenin noch weitere, unbekannte Transkriptionsfaktoren an der Expression von Slit-2 beteiligt sein könnten.

#### 4.5.5 Einfluss von Slit-2 auf die Zellmigration

Da Slit-2 als Chemorepellent die Migration verschiedener Zellen beeinflusst (Mertsch *et al.*, 2008) (Prasad *et al.*, 2004) (Werbowski-Ogilvie *et al.*, 2006), wurde in funktionellen Migrationsexperimenten der Effekt von Slit-2 auf die PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen untersucht.

Bereits im Ergebnisteil I wurde gezeigt, dass die P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen signifikant langsamer wandern als die Mock-transfizierten PCI52\_Zellen (Abbildung 12B). Wurden die PCI52\_PC-Zellen zusätzlich mit Slit-2 inkubiert, so nahm die Migrationsfähigkeit dieser Zellen nochmals signifikant ab (Abbildung 24). Keine Veränderung in der Migration konnte man jedoch nach Slit-2-Inkubation bei den PCI52\_Mock-Zellen beobachten (Abbildung 24).



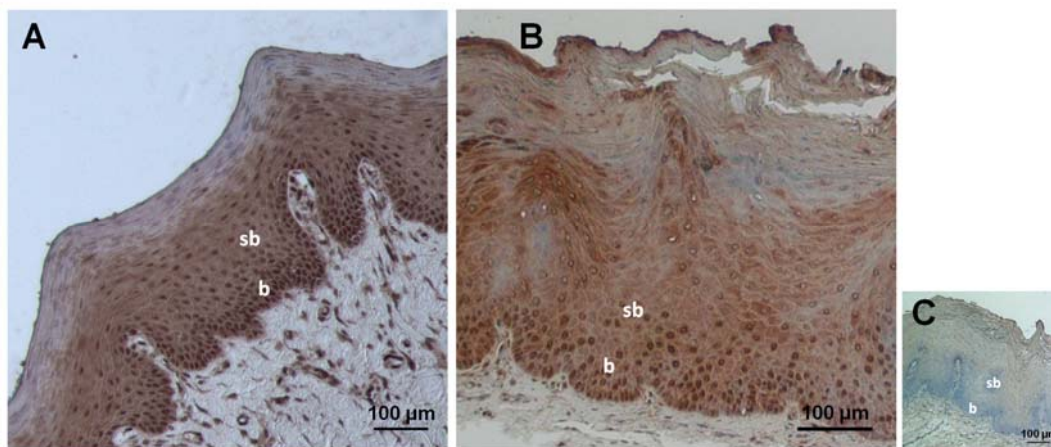
**Abbildung 24**  
Einfluss von Slit-2 auf die Zellmigration der PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen (aus Bauer *et al.*, 2011).



## 4.6 Die Rolle von Robo-3 in der OSCC-Zelllinie PCI52

### 4.6.1 Expression von Robo-3 in der oralen Mukosa

Um die Wirkung von Slit-2 auf die P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen erklären zu können, wurde nach einer Verbindung zwischen Robo-3, dem hoch-affinen Rezeptor von Slit-2 (Sabatier *et al.*, 2004), und P-Cadherin gesucht. Immunhistologische Färbungen zeigten, dass Robo-3 in denselben basalen und suprabasalen Zellschichten des oralen Epithels exprimiert wird (Abbildung 25A, B) wie P-Cadherin und Slit-2 (Abbildung 9A, B, C, Abbildung 19A, B, C).

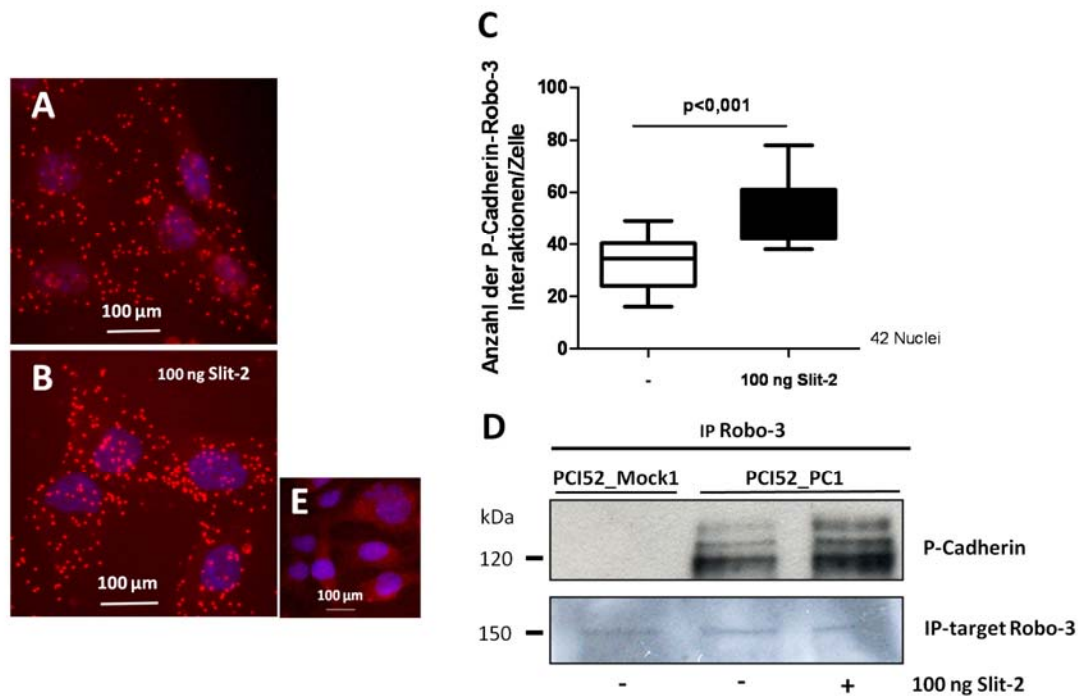


**Abbildung 25**

**Expression von Robo-3 in der oralen Mukosa (A, B), Negativkontrolle orale Mukosa (C)** (b = basal, sb = suprabasal).

### 4.6.2 Nachweis der P-Cadherin/Robo-3-Interaktion

Aufgrund der gleichen Lokalisation wurde versucht, *in vitro* und *in vivo* die Interaktionen zwischen P-Cadherin und Robo-3 zu detektieren. PLAs, die zum Nachweis von Protein-Interaktionen dienen, bestätigten eine Verbindung zwischen P-Cadherin und Robo-3 in den P-Cadherin exprimierenden PCI52-Zellen (Abbildung 26A). Interessanterweise nahm die Anzahl dieser Interaktionen nach Inkubation mit Slit-2 in den PCI52\_PC-Zellen signifikant zu (Abbildung 26B, C). Zusätzlich durchgeführte Immunpräzipitationen belegten die Interaktion von P-Cadherin und Robo-3 in den PCI52\_PC-Zellen und die Zunahme der P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen nach Slit-2-Behandlung (Abbildung 26D).

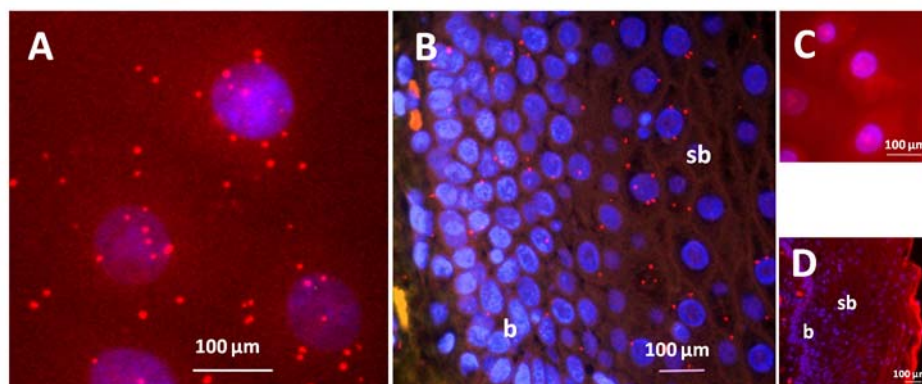


**Abbildung 26**

**Nachweis der P-Cadherin/Robo-3-Interaktion *in vitro*.**

Nachweis der P-Cadherin/Robo-3-Interaktion mittels PLA in PCI52\_PC-Zellen (A) und in PCI52\_PC-Zellen nach Slit-2-Inkubation (B). Quantifizierung der P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen in den PCI52\_PC-Zellen mit und ohne Slit-2-Behandlung (C). Nachweis der Zunahme der P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen in den PCI52\_PC-Zellen durch Slit-2-Inkubation mittels Immunpräzipitation (D), Negativkontrolle PCI52\_PC-Zellen (E) (verändert nach Bauer *et al.*, 2011).

Auch in HOKs wurden P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen, verstreut über die ganze Zelle, entdeckt (Abbildung 27A). In den basalen Zellschichten der gesunden, oralen Mukosa interagierte P-Cadherin ebenfalls mit Robo-3 (Abbildung 27B).

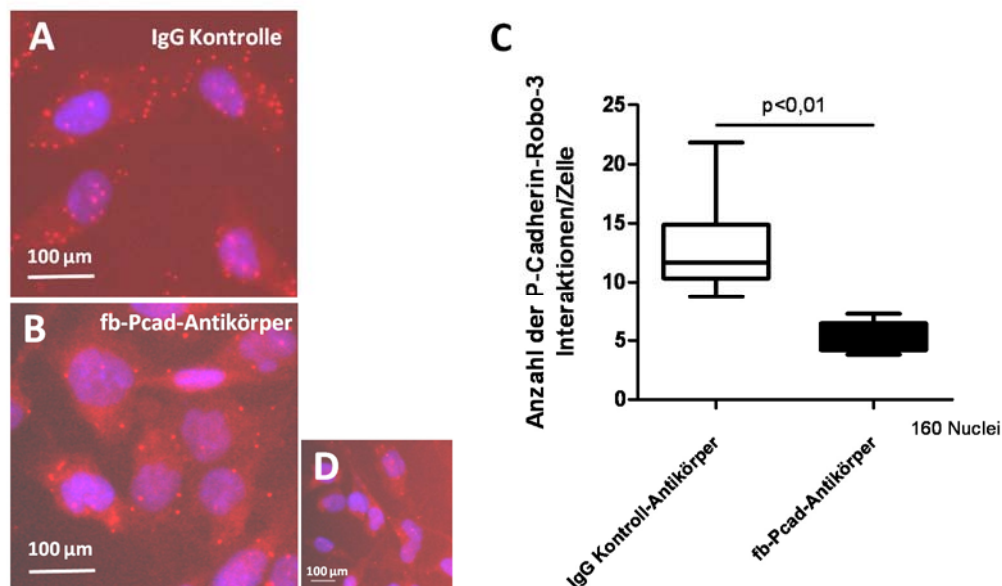


**Abbildung 27**

**Nachweis der P-Cadherin/Robo-3-Interaktion *in vitro* und *in vivo*.**

Nachweis der P-Cadherin/Robo-3-Interaktion in HOKs (A) und *in vivo* in basalen und suprabasalen Zellschichten oraler Mukosa (B) mittels PLA, Negativkontrolle HOK (C), Negativkontrolle orale Mukosa (D) (b = basal, sb = suprabasal) (verändert nach Bauer *et al.*, 2011).

Wurde in den PCI52\_PC-Zellen die Funktion von P-Cadherin mit dem fb-Pcad-Antikörper inhibiert, so konnte man im anschließenden PLA weniger P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen beobachten als nach der Behandlung der Zellen mit einem unspezifischen IgG-Kontroll-Antikörper (Abbildung 28A, B). Die Quantifizierung von 160 Zellkernen ergab eine ca. 40%ige Abnahme der P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen nach Inhibierung der P-Cadherin-Funktion (Abbildung 28C). Durch die Verwendung des fb-Pcad-Antikörpers wurden die P-Cadherin-P-Cadherin-Interaktionen gestört und dadurch wurde weniger Slit-2 sezerniert (Abbildung 22). Die Abnahme der Slit-2-Konzentration führte dazu, dass sich in den PCI52\_PC-Zellen weniger P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen bilden konnten.



**Abbildung 28**

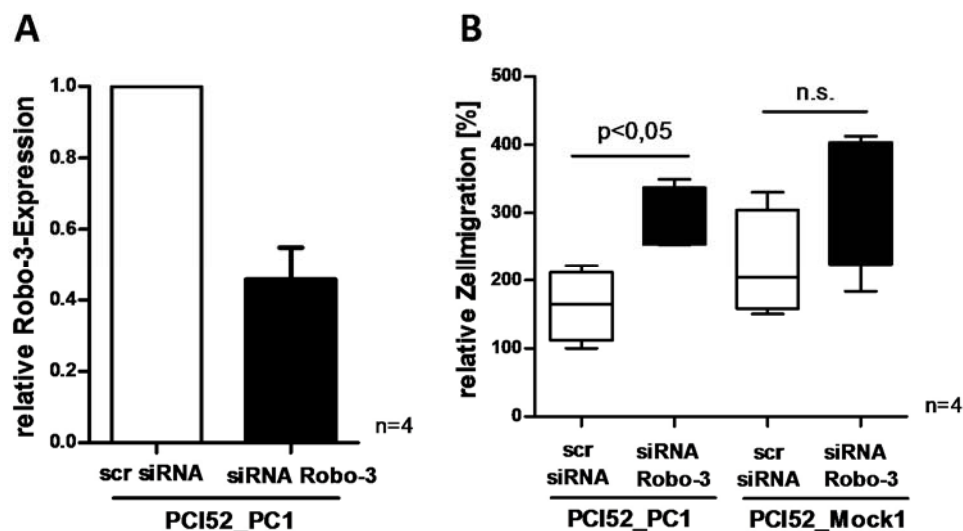
**Einfluss der P-Cadherin-Funktion auf die P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen.**

P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen in PCI52\_PC-Zellen (A) und in PCI52\_PC-Zellen nach Inhibierung der P-Cadherin-Funktion mittels fb-Pcad-Antikörper (B). Quantifizierung der P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen in PCI52\_PC-Zellen vor und nach der Inhibierung der P-Cadherin-Funktion mittels fb-Pcad-Antikörper (C), Negativkontrolle PCI52\_PC-Zellen (D) (verändert nach Bauer *et al.*, 2011).

#### 4.6.3 Einfluss des Robo-3-Knockdowns auf die Zellmigration

Um zu untersuchen, welche Rolle der Robo-3-Rezeptor bei der Migration der PCI52-Zellen spielt, wurde die Robo-3-Expression mit Hilfe von siRNA in den PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen unterdrückt. Die Transfektion mit siRNA Robo-3 ergab durchschnittlich einen Knockdown von ca. 60% im Vergleich zu den mit der Kontroll-

siRNA (scr siRNA) transfizierten Zellen (Abbildung 29A). In anschließenden Migrationsexperimenten konnte man interessanterweise nur in den Slit-2 produzierenden PCI52\_PC-Zellen eine signifikante Steigerung der Zellmigration beobachten (Abbildung 29B). Der Robo-3-Knockdown in den PCI52\_Mock-Zellen führte zu keinem signifikanten Migrationseffekt (Abbildung 29B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Knockdown des Robo-3-Rezeptors den Slit-2-induzierten Migrationsstopp in den PCI52\_PC-Zellen neutralisiert (Abbildung 24).



**Abbildung 29**

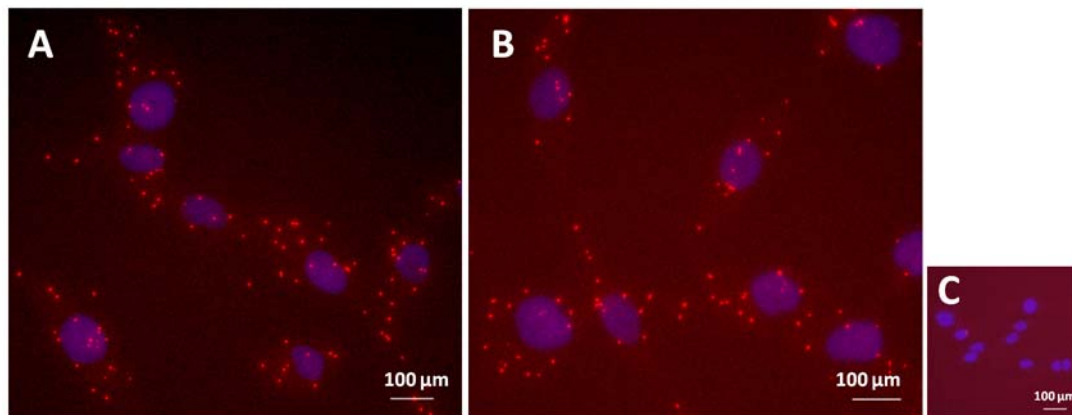
**Einfluss des Robo-3-Knockdowns auf die Zellmigration.**

Analyse der Robo-3-Expression nach Robo-3-Knockdown (**A**). Zellmigration der PCI52\_PC- und PCI52\_Mock-Zellen nach Robo-3-Knockdown (**B**) (aus Bauer *et al.*, 2011).

#### 4.6.4 Nachweis der Robo-3/Abl-Interaktion

Auf der Suche nach Proteinen, die an der Bildung des P-Cadherin/Robo-3-Komplexes beteiligt sein könnten, wurde die Tyrosinkinase Abl näher untersucht. Rhee *et al.* beobachteten, dass Abl, welches an den konservierten C-terminalen Motiven des Robo-Rezeptors bindet, den Rezeptor intrazellulär mit N-Cadherin verbindet (Rhee *et al.*, 2002).

Die Beteiligung von Abl bei den P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen belegten PLA-Experimente. Diese zeigten eine direkte Interaktion von Robo-3 mit Abl sowohl in den PCI52\_PC- (Abbildung 30A) als auch in den PCI52\_Mock-Zellen (Abbildung 30B).



**Abbildung 30**

**Nachweis der Robo-3/Abl-Interaktion *in vitro*.**

Nachweis der Robo-3/Abl-Interaktion in den PCI52\_PC- (A) und PCI52\_Mock-Zellen (B) mittels PLA, Negativkontrolle PCI52\_PC-Zellen (C).

## 4.7 Zusammenfassung Teil II

Im diesem Teil der Dissertation ist der Zusammenhang zwischen P-Cadherin und dem Slit/Robo-Signalweg untersucht worden. Experimente mit den P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen ergaben, dass die Slit-2-Expression und –Sekretion von der Funktionalität von P-Cadherin abhängig war. Zusätzlich regulierte Slit-2 über den Wnt-Signalweg seine eigene Expression, indem Slit-2 negativ auf den Transkriptionsfaktor beta-Catenin wirkte. Funktionell inhibierte Slit-2 die Migration von P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen durch Verstärkung der Interaktion von seinem Rezeptor Robo-3 mit dem Adhäsionsprotein P-Cadherin.

### **Teil III**

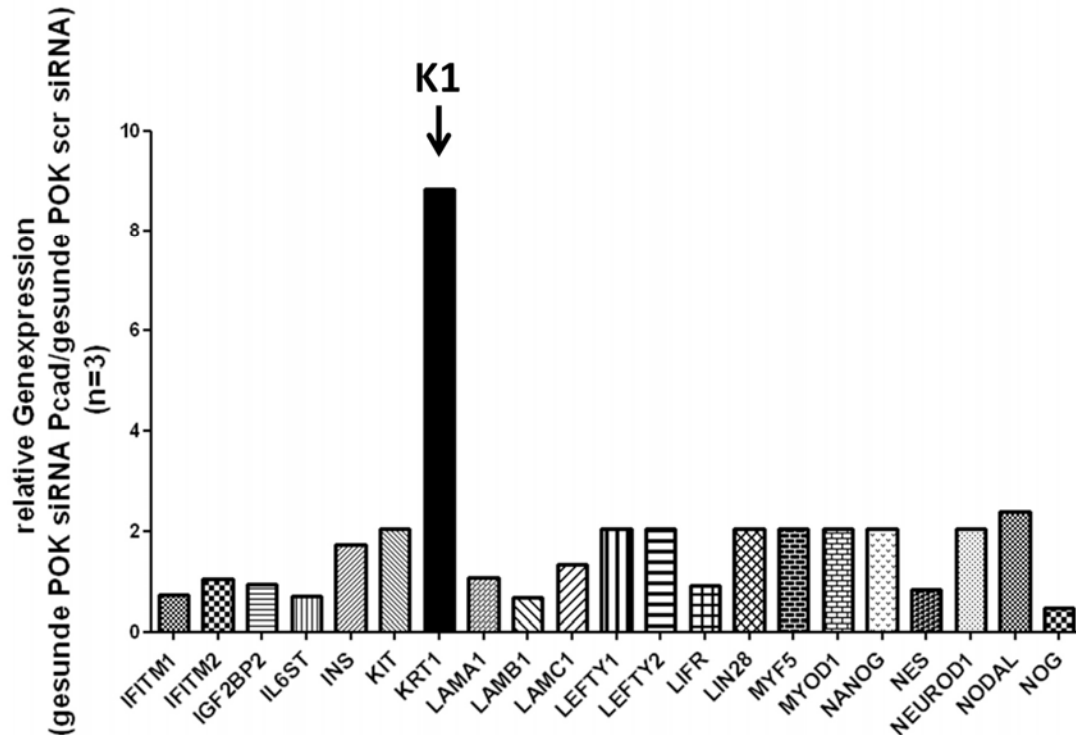
## **P-Cadherin reguliert in gesunden, primären, oralen Keratinozyten die Keratin-1- und Keratin-10-Expression**

In der oralen Mukosa sorgt P-Cadherin, welches nur in den basalen und suprabasalen Zellschichten exprimiert wird, durch Ausbildung homophiler Cadherin-Cadherin-Interaktionen für interzelluläre Adhäsion. Zusätzliche Funktionen von P-Cadherin sowie die Frage nach dem funktionellen Unterschied zwischen P-Cadherin und E-Cadherin im oralen Epithel sollten im dritten Teil dieser Dissertation geklärt werden.

### **4.8 Die Rolle von P-Cadherin bei der Keratin-Expression**

#### **4.8.1 Einfluss von P-Cadherin auf die Keratin-1- und Keratin-10-Expression**

Um die Funktion von P-Cadherin in den basalen und suprabasalen Zellschichten des gesunden, oralen Epithels festzustellen, wurde die mRNA-Expression von P-Cadherin in humanen oralen Keratinozyten mit Hilfe von siRNA-Transfektion reduziert. Ein humaner Stammzell-Array, der Primer der kodierenden Sequenz von Genen, welche an der Stammzell-Proliferation und -Differenzierung beteiligt sind, enthält, zeigte eine signifikante, 8-fache Zunahme der Keratin-1-(K1) Expression nach P-Cadherin-Knockdown in gesunden, primären, oralen Keratinozyten (gesunde POK) (Abbildung 31).



**Abbildung 31**

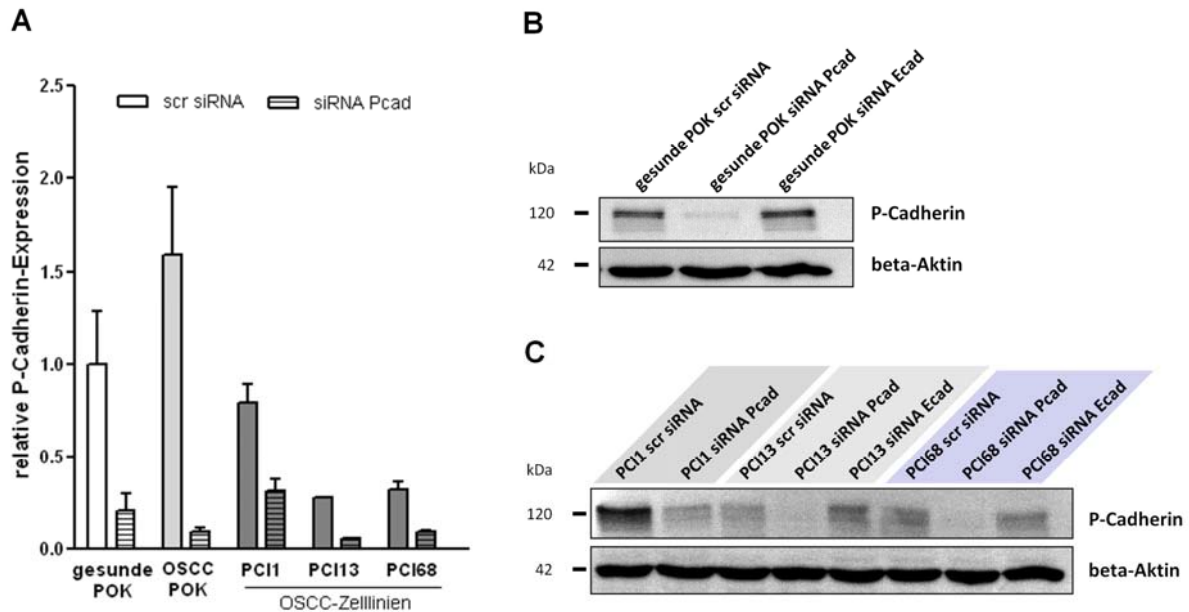
**Einfluss des P-Cadherin-Knockdowns auf die Expression von Stammzell-spezifischen Proliferations- und Differenzierungsmarkern in gesunden POKs.**

Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Stammzell-Arrays. Nach Reduzierung der P-Cadherin-mRNA-Expression in gesunden POKs erhöhte sich die K1-Expression signifikant im Vergleich zu gesunden POKs mit regulärer P-Cadherin-Expression.

Um den in dem Stammzell-Array beobachteten Zusammenhang zwischen P-Cadherin und K1 zu bestätigen, wurde die Expression von K1 nach P-Cadherin-Knockdown in gesunden POKs sowie in OSCC POKs und in verschiedenen OSCC-Zelllinien auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht.

Da in den postmitotischen, suprabasalen Zellen des oralen Epithels K1 zusammen mit Keratin-10 (K10) als wichtige Differenzierungsmarker gelten und nur gemeinsam exprimiert werden (Fuchs, 1988), wurde die Expression von K10 nach P-Cadherin-Knockdown ebenfalls in diesen Zellen analysiert.





**Abbildung 32**

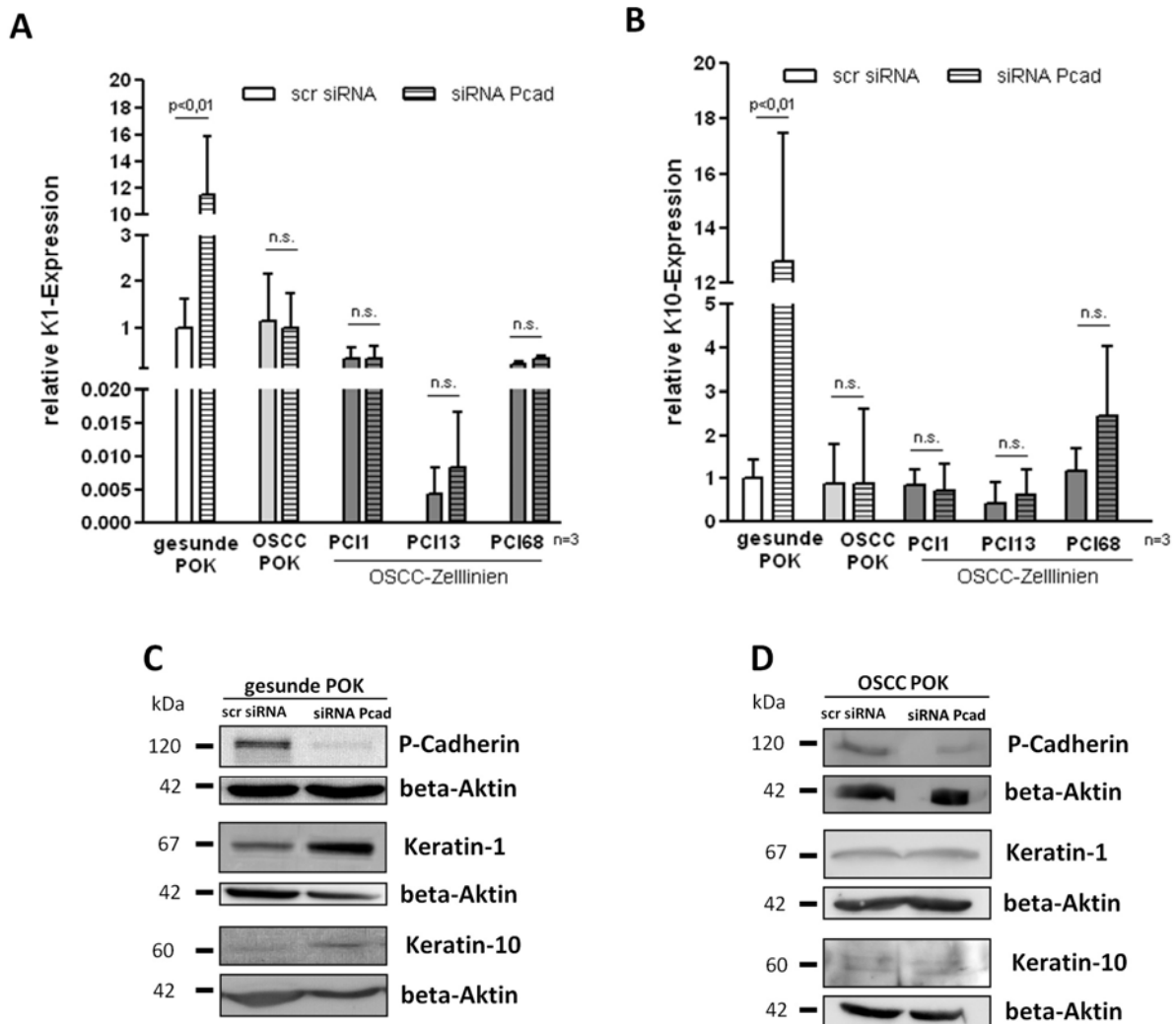
**Nachweis des P-Cadherin-Knockdowns nach siRNA-P-Cadherin-Transfektion.**

Analyse der P-Cadherin-Expression nach siRNA-P-Cadherin-Transfektion auf mRNA- (A) und Protein-Ebene (B, C) in gesunden POKs, OSCC POKs und OSCC-Zelllinien.

Zur Bestätigung des P-Cadherin-Knockdowns auf mRNA- und Protein-Ebene wurden qPCR- und Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Abbildung 32A zeigt in gesunden POKs, in OSCC POKs, welche aus solider Primärtumormasse isoliert wurden und eine relativ hohe P-Cadherin-Expression aufwiesen, sowie in OSCC-Zelllinien auf mRNA-Ebene einen P-Cadherin-Knockdown zwischen 60% und 90%. Auch auf Protein-Ebene ist diese reduzierte P-Cadherin-Expression deutlich zu sehen (Abbildung 32B, C).

Anschließend qPCR-Analysen bestätigten die qPCR-Daten aus dem humanen Stammzell-Array. Wie erwartet zeigt Abbildung 33A und Abbildung 33C eine signifikante Zunahme der K1-Expression in gesunden POKs nach P-Cadherin-Knockdown auf mRNA- (ca. 12-fach) und auf Protein-Ebene. Interessanterweise führte der P-Cadherin-Knockdown in gesunden POKs ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der K10-Expression auf mRNA- (Abbildung 33B) und Protein-Level (Abbildung 33C). In OSCC POKs sowie in den drei OSCC-Zelllinien konnte man weder auf mRNA- (Abbildung 33A, B) noch auf Protein-Ebene (Abbildung 33D) eine Veränderung der K1/10-Expression nach P-Cadherin-Knockdown feststellen.



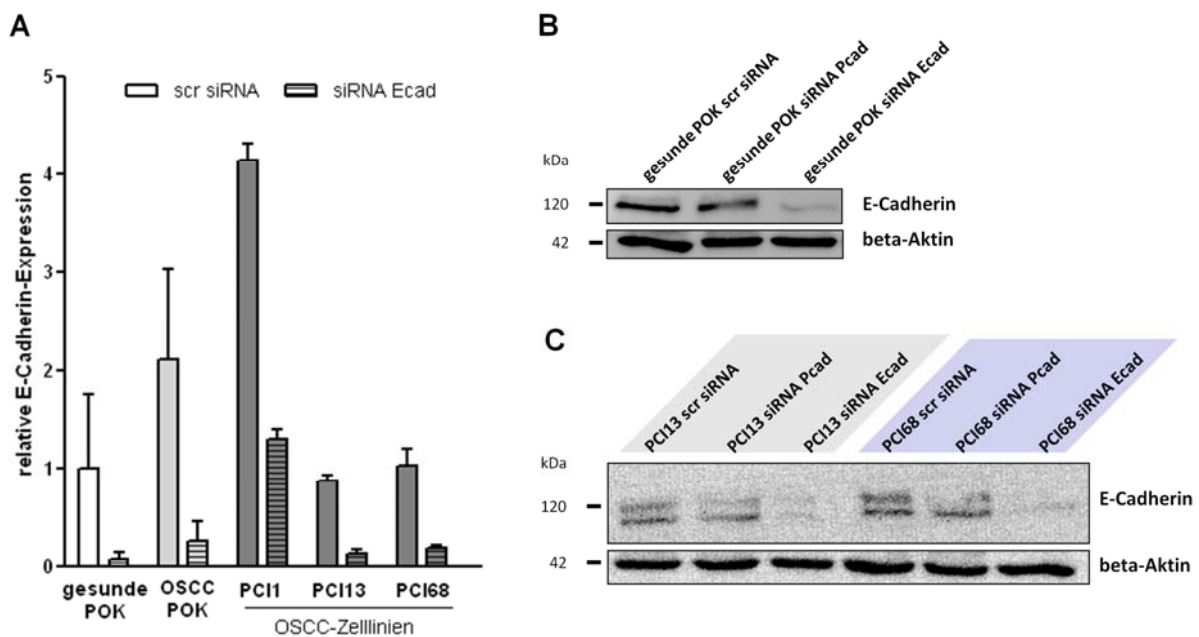
**Abbildung 33****Einfluss des P-Cadherin-Knockdowns auf die Keratin-1/10-Expression.**

Expression von Keratin-1/10 nach P-Cadherin-Knockdown auf mRNA- (A, B) und Protein-Ebene (C, D) in gesunden POKs, OSCC POKs und OSCC-Zelllinien.

**4.8.2 Einfluss von E-Cadherin auf die Keratin-1- und Keratin-10-Expression**

Um zu prüfen, ob der beobachtete Zusammenhang nur für P-Cadherin und nicht für andere Cadherine, wie z. B. E-Cadherin, welches im gesamten oralen Epithel außer in den basalen Zellen exprimiert wird (Munoz-Guerra *et al.*, 2005), gilt, wurde die Expression des Keratinpaares K1/10 zusätzlich auch nach E-Cadherin-Knockdown untersucht.

Zur Bestätigung des E-Cadherin-Knockdowns auf mRNA- und Protein-Ebene wurden qPCR- und Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Abbildung 34A zeigt in gesunden POKs, in OSCC POKs, welche aus solider Primärtumormasse isoliert wurden, sowie in OSCC-Zelllinien auf mRNA-Ebene einen E-Cadherin-Knockdown zwischen 70% und 90%. Auch auf Protein-Ebene ist diese reduzierte E-Cadherin-Expression deutlich zu sehen (Abbildung 34B, C).

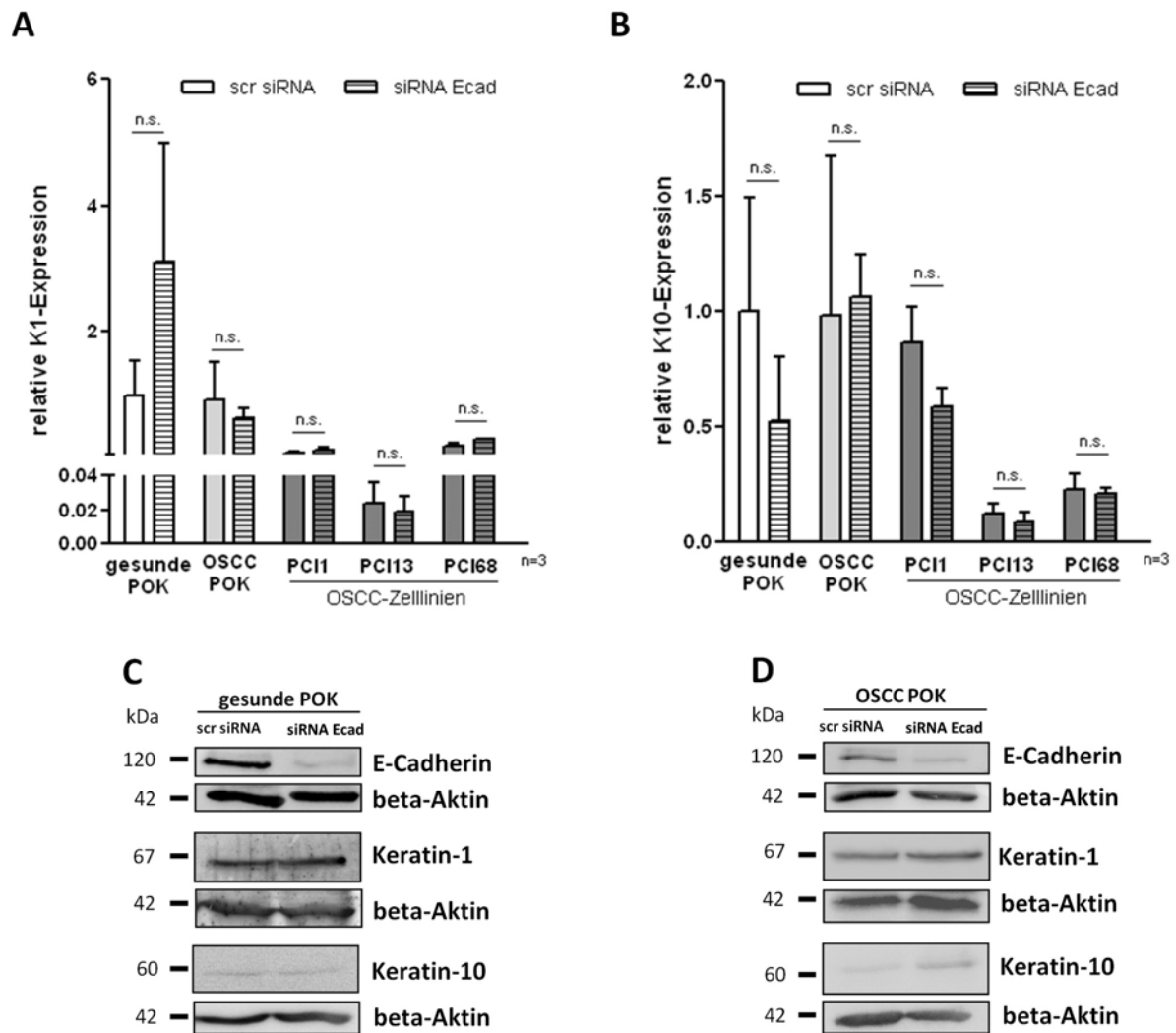


**Abbildung 34**

**Nachweis des E-Cadherin-Knockdowns nach siRNA-E-Cadherin-Transfektion.**

Analyse der E-Cadherin-Expression nach siRNA-E-Cadherin-Transfektion auf mRNA- (A) und Protein-Ebene (B, C) in gesunden POKs, OSCC POKs und OSCC-Zelllinien.

Die in gesunden POKs durch P-Cadherin-Knockdown induzierte K1/10-Expression konnte jedoch nicht nach E-Cadherin-Knockdown beobachtet werden. Die reduzierte E-Cadherin-Expression modulierte in gesunden POKs, in OSCC POKs sowie in den OSCC-Zelllinien die K1/10-Expression weder auf mRNA- (Abbildung 35A, B) noch auf Protein-Ebene (Abbildung 35C, D).

**Abbildung 35****Einfluss des E-Cadherin-Knockdowns auf die Keratin-1/10-Expression.**

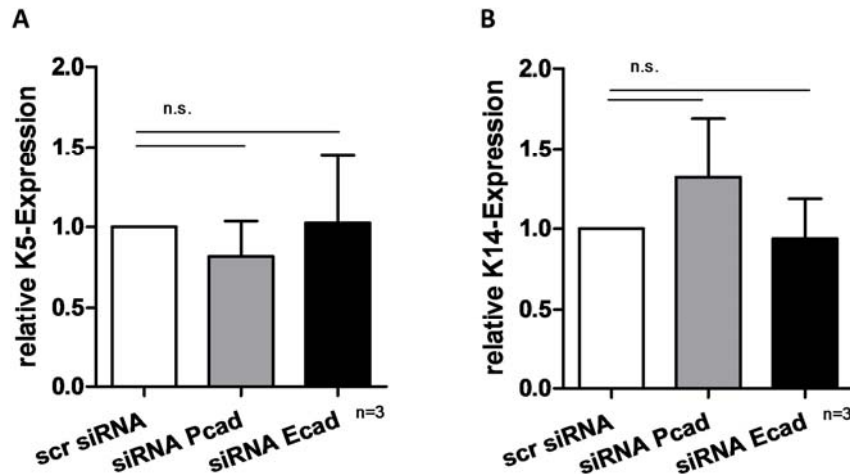
Expression von Keratin-1/10 nach E-Cadherin-Knockdown auf mRNA- (A, B) und Protein-Ebene (C, D) in gesunden POKs, OSCC POKs und OSCC-Zelllinien.

**4.8.3 Einfluss von P-Cadherin auf die Keratin-5- und Keratin-14-Expression**

Die Keratine K5 und K14, welche von basalen Keratinozyten exprimiert werden, werden in suprabasalen Keratinozyten durch die Keratine K1 und K10 ersetzt (Fuchs, 1988). Da P-Cadherin im Epithel in den basalen und suprabasalen Zellschichten exprimiert wird, wurde als Nächstes untersucht, ob P-Cadherin neben der K1/10-Expression auch die K5/14-Expression regulieren kann.

Die Abbildung 36A und B zeigen jedoch, dass eine Verringerung der P-Cadherin-mRNA-Expression in gesunden POKs die Expression der basalen Keratine K5/14 im Gegensatz zu den suprabasalen Keratinen K1/10 nicht verändert. Auch eine

reduzierte E-Cadherin-mRNA-Expression beeinflusste weder die K5- noch die K14-Expression (Abbildung 36A, B).



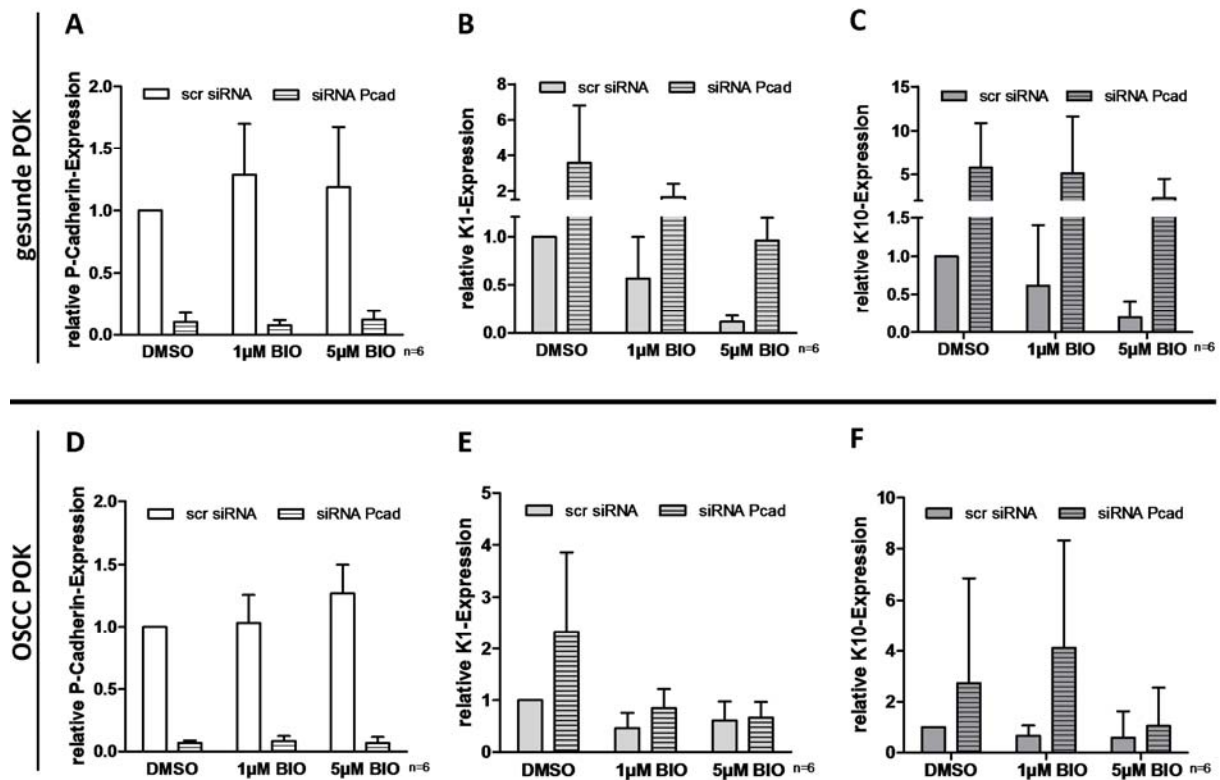
**Abbildung 36**  
Expression von Keratin-5 (A) und Keratin-14 (B) in gesunden POKs nach P-Cadherin- bzw. E-Cadherin-Knockdown.

#### 4.8.4 Einfluss von GSK3-beta auf die Keratin-1- und Keratin-10-Expression

Aufgrund der im Teil I der Dissertation berichteten Assoziation zwischen der P-Cadherin-Expression und dem Aktivitätsstatus von GSK3-beta, wurde nun überprüft, ob die induzierte K1/10-Expression nach P-Cadherin-Knockdown infolge einer Änderung der GSK3-beta-Aktivität erfolgt. Daher wurde in POKs nach siRNA-P-Cadherin-Transfektion GSK3-beta mit dem pharmakologischen Reagenz BIO selektiv blockiert und der Wnt-Signalweg aktiviert.

Um zu überprüfen, ob der Inhibitor selbst die P-Cadherin-Expression nach P-Cadherin-Knockdown moduliert, wurde in gesunden und in OSCC POKs die Expression von P-Cadherin nach BIO-Behandlung analysiert. Abbildung 37A und D beweisen, dass die GSK3-beta-Inhibierung die P-Cadherin-Expression in gesunden POKs sowie in OSCC POKs nicht beeinflusst. Quantitative RT-PCR-Analysen von gesunden POKs sowohl mit regulärer als auch mit reduzierter P-Cadherin-Expression zeigten nach GSK3-beta-Inhibierung eine Dosis-abhängige, proportional äquivalente Abnahme der K1/10-Expression (Abbildung 37B, C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Wnt/GSK3-beta vermittelte Signalweg

nicht an der durch P-Cadherin-Knockdown induzierten K1/10-Expression beteiligt ist. Die K1/10-Expression in OSCC POKs dagegen wurde durch GSK3-beta-Inhibierung kaum beeinflusst (Abbildung 37E, F).



**Abbildung 37**

**Einfluss von BIO auf die P-Cadherin-, Keratin-1- und Keratin-10-Expression.**

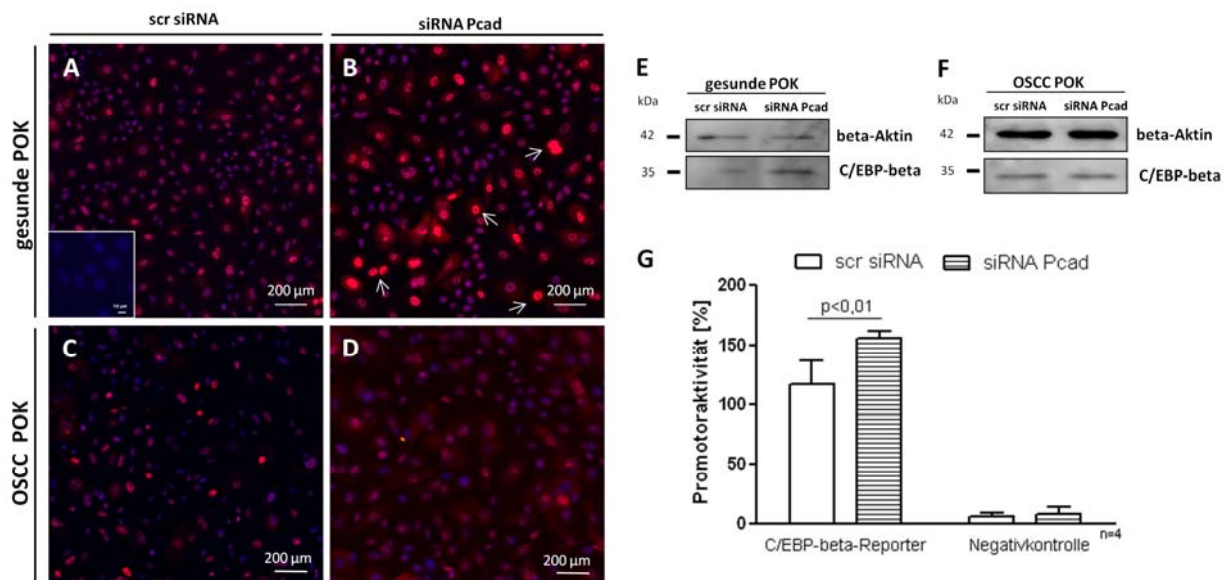
Expression von P-Cadherin (A, D), Keratin-1 (B, E) und Keratin-10 (C, F) in gesunden POKs und OSCC POKs nach P-Cadherin-Knockdown und anschließender Inhibierung von GSK3-beta mit Hilfe von BIO.

#### 4.8.5 Einfluss von P-Cadherin auf die Expression und Lokalisation von C/EBP-beta

Aufgrund von Publikationen von Maytin *et al.* und Lopez *et al.*, welche von einer C/EBP-beta-abhängigen K1/10-Expression in Keratinozyten berichteten (Maytin *et al.*, 1999) (Lopez *et al.*, 2009), wurde die Expression und Lokalisation dieses Transkriptionsfaktors in gesunden und OSCC POKs nach P-Cadherin-Knockdown untersucht.

Immunfluoreszenzfärbungen von gesunden POKs, welche mit siRNA gegen P-Cadherin transfiziert worden waren (Abbildung 38B, weiße Pfeile), zeigten eine

verstärkte, nukleäre C/EBP-beta-Lokalisation im Vergleich zu gesunden POKs, welche mit *scr* siRNA transfiziert worden waren (Abbildung 38A). Zusätzlich konnte man im Vergleich zu gesunden POKs mit normaler P-Cadherin-Expression auf Protein-Ebene eine verstärkte C/EBP-beta-Expression in gesunden POKs mit reduzierter P-Cadherin-Expression beobachten (Abbildung 38E). OSCC POKs wiesen dagegen eine schwächere C/EBP-beta-Färbung auf (Abbildung 38C, D), wobei man den Transkriptionsfaktor nach P-Cadherin-Knockdown vor allem im Zytoplasma erkennen konnte (Abbildung 38D). Western Blot-Analysen zeigten keine Änderung der C/EBP-beta-Expression in OSCC POKs mit reduzierter P-Cadherin-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 38F).



**Abbildung 38**

**Einfluss des P-Cadherin-Knockdowns auf die Expression und Lokalisation von C/EBP-beta.**

Lokalisation von C/EBP-beta in gesunden POKs (**A**, **B**) und OSCC POKs (**C**, **D**) nach Transfektion mit *scr* siRNA bzw. siRNA gegen P-Cadherin (kleines Bild in A: Negativkontrolle). Expression von C/EBP-beta in gesunden POKs (**E**) und OSCC POKs (**F**) nach Transfektion mit *scr* siRNA bzw. siRNA gegen P-Cadherin. C/EBP-beta abhängige Promotoraktivität in gesunden POKs mit regulärer und mit reduzierter P-Cadherin-Expression (**G**).

Um die verstärkte C/EBP-beta-Lokalisation im Zellkern nach P-Cadherin-Knockdown in gesunden POKs zu bestätigen, wurde ein Luciferase Reporter Gen Assay durchgeführt. Zusätzlich zur siRNA-P-Cadherin-Transfektion wurden gesunde POKs mit einem C/EBP-Reporter, welcher vor dem *Firefly*-Luciferase-Konstrukt C/EBP-Bindestellen enthält, transfiziert. Im Vergleich zu gesunden POKs mit normaler

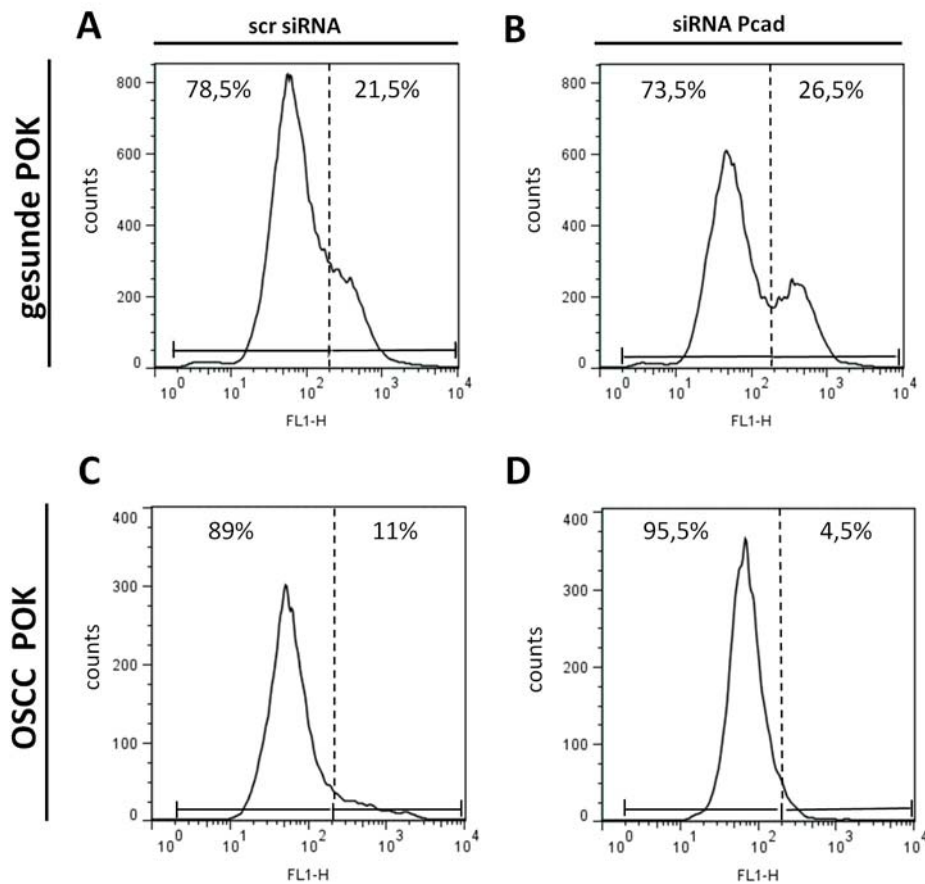
P-Cadherin-Expression wiesen die gesunden POKs mit reduzierter P-Cadherin-Expression eine signifikant höhere Promotoraktivität des C/EBP-abhängigen Luciferase-Konstruktes auf (Abbildung 38G). Die Negativkontrollen zeigten nur eine minimale Promotoraktivität (Abbildung 38G).

#### **4.9 Der Einfluss von P-Cadherin auf die Proliferation von Keratinozyten**

In gesunden POKs führt die reduzierte Expression von P-Cadherin zur verstärkten Expression der Differenzierungsmarker K1 und K10. Aufgrund dessen müssten die gesunden POKs mit reduzierter P-Cadherin-Expression auch langsamer proliferieren als gesunde POKs mit normaler P-Cadherin-Expression. Daher wurden zur Messung der Proliferation im Durchflusszytometer gesunde und OSCC POKs zuerst mit siRNA gegen P-Cadherin transfiziert und anschließend mit CFSE gefärbt. CFSE ist ein zellpermeables Fluorescein-Derivat, das nach Abspaltung von Acetat-Gruppen durch zelluläre Esterasen als fluoreszierendes Molekül in der Zelle zurückbleibt. Mit dieser Methode kann man im Durchflusszytometer die einzelnen Generationen einer Zellpopulation unterscheiden. Zur Auswertung des Proliferationsverhaltens der POKs wurden die Proliferationsgraphen in mehrere Generationsabschnitte unterteilt, wobei der rechte Abschnitt die Zellgeneration 1 zeigt.

In Abbildung 39 kann man erkennen, dass der Verlust der P-Cadherin-mRNA-Expression zu einer Verzögerung der Proliferation in gesunden POKs führt. Durchflusszytometrische Analysen demonstrierten in gesunden POKs mit regulärer P-Cadherin-Expression 21,5% der Zellen in Generation 1 und 78,5% der Zellen in Generation 2 (Abbildung 39A). Nach P-Cadherin-Knockdown konnte man in den gesunden POKs 26,5% in Generation 1 und 73,5% in Generation 2 beobachten (Abbildung 39B). OSCC POKs dagegen zeigten nach P-Cadherin eine verstärkte Proliferation. FACS-Analysen von OSCC POKs mit normaler P-Cadherin-Expression detektierten 11% in Generation 1 und 89% in Generation 2 (Abbildung 39C). Nach siRNA-P-Cadherin-Transfektion konnte man in den OSCC POKs 4,5% in Generation 1 und 95,5% in Generation 2 messen (Abbildung 39D).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass gesunde, orale Keratinozyten, welche P-Cadherin exprimieren, einen Proliferationsvorteil gegenüber gesunden, oralen Keratinozyten mit reduzierter P-Cadherin-Expression besitzen.



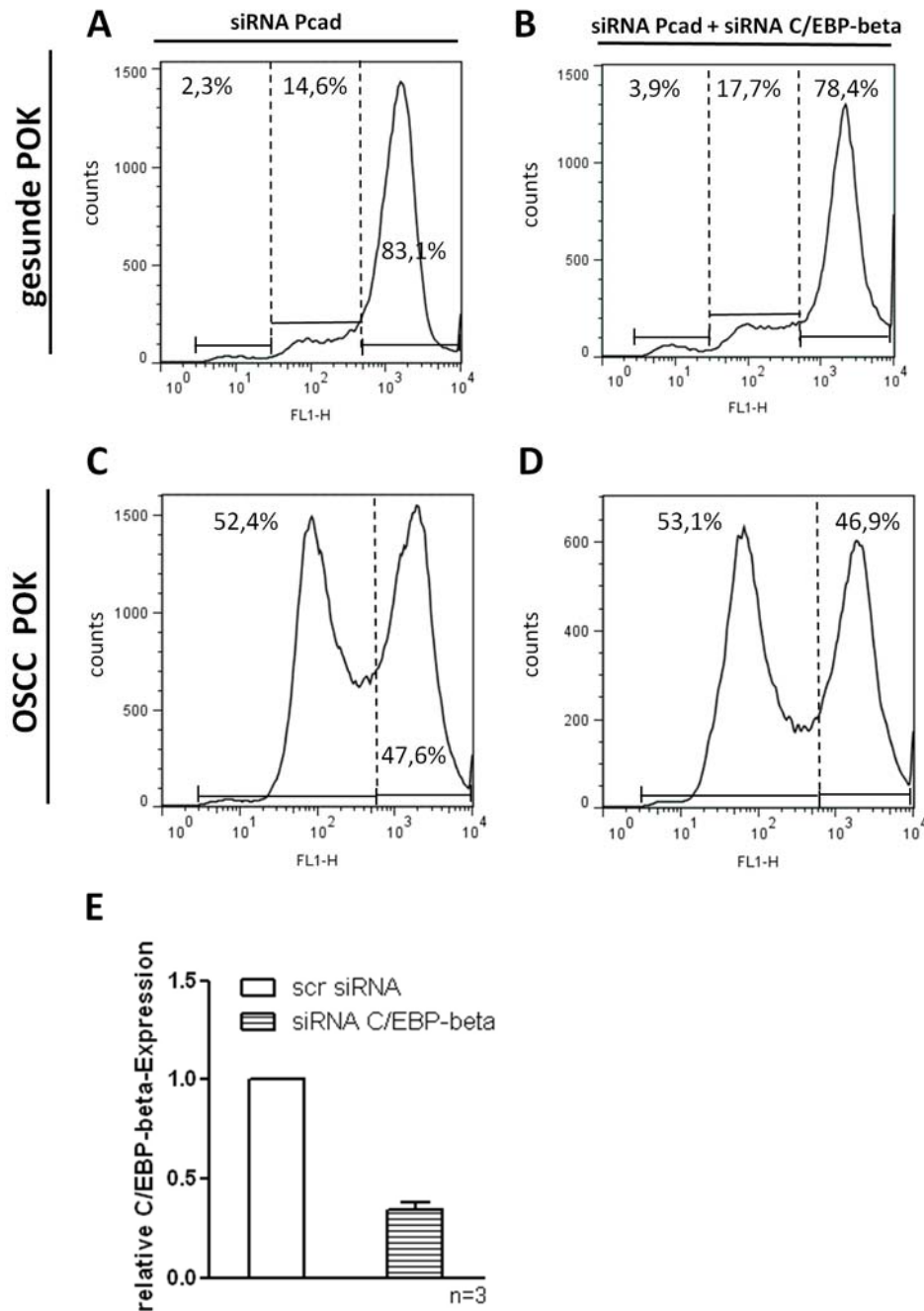
**Abbildung 39**

**Einfluss des P-Cadherin-Knockdowns auf die Proliferation von gesunden POKs und OSCC POKs.**

Proliferationsverhalten von gesunden POKs (A, B) und OSCC POKs (C, D) mit regulärer und mit reduzierter P-Cadherin-Expression (rechte Seite der FACS-Analyse: Zellgeneration 1, linke Seite der FACS-Analyse: Zellgeneration 2).

In gesunden POKs führte der Knockdown von P-Cadherin zur verstärkten Expression, zur verstärkten, nukleären Lokalisation und zur verstärkten Aktivität von C/EBP-beta. Zusätzlich wiesen gesunde POKs nach P-Cadherin-Knockdown eine verlangsamte Zellproliferation auf. Um zu zeigen, dass C/EBP-beta an der verzögerten Proliferation beteiligt ist, wurden gesunde POKs neben siRNA P-Cadherin zusätzlich mit siRNA gegen C/EBP-beta transfiziert. Anschließend wurden in durchflusszytometrischen Analysen die Generationszyklen untersucht.



**Abbildung 40****Einfluss des P-Cadherin- und C/EBP-beta-Knockdowns auf die Proliferation von gesunden POKs und OSCC POKs.**

Proliferationsverhalten von gesunden POKs (A, B) und OSCC POKs (C, D) mit reduzierter P-Cadherin-Expression sowie mit reduzierter P-Cadherin- und C/EBP-beta-Expression (rechte Seite der FACS-Analyse: Zellgeneration 1, mittlere und linke Seite der FACS-Analyse: nachfolgende Zellgenerationen). Nachweis des C/EBP-beta-Knockdowns nach siRNA-C/EBP-beta-Transfektion in gesunden POKs mit Hilfe von qRT-PCR (E).

Zur Bestätigung der erfolgreichen C/EBP-beta-Transfektion zeigt die qRT-PCR in Abbildung 40E einen C/EBP-beta-Knockdown von circa 60%. Nach Auswertung der FACS-Analysen von gesunden POKs mit normaler P-Cadherin-Expression befanden

sich 83,1% der Zellen in Generation 1, 14,6% in Generation 2 und 2,3% in Generation 3 (Abbildung 40A). Nach gleichzeitiger siRNA-P-Cadherin- und siRNA C/EBP-beta-Transfektion konnte man jedoch in gesunden POKs 78,4% der Zellen in Generation 1, 17,7% in Generation 2 und 3,9% in Generation 3 beobachten (Abbildung 40B). Diese Daten weisen darauf hin, dass C/EBP-beta zur Verzögerung der Zellproliferation in gesunden POKs beiträgt.

Nach P-Cadherin-Knockdown in OSCC POKs konnte man 47,6% der Zellen in Generation 1 und 52,4% in Generation 2 erkennen (Abbildung 40C). Nach der gleichzeitigen Transfektion von OSCC POKs mit siRNA gegen P-Cadherin und siRNA gegen C/EBP-beta konnte man 46,9% der Zellen in Generation 1 und 53,1% der Zellen in Generation 2 detektieren (Abbildung 40D).

### **4.10 Zusammenfassung Teil III**

In diesem Teil der Dissertation wurden die Auswirkungen des P-Cadherin-Knockdowns auf die Differenzierung von gesunden, primären, oralen Keratinozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Verlust von P-Cadherin unterschiedliche Effekte auf gesunde, orale Keratinozyten im Vergleich zu Keratinozyten, welche aus OSCC-Gewebe isoliert worden waren, hatte. Die Reduktion der P-Cadherin-Expression führte zur Differenzierung der gesunden, oralen Keratinozyten, was in einem signifikanten Anstieg der K1- und K10-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene zu beobachten war. OSCC-Keratinozyten, welche mitten aus dem Primärtumor isoliert worden waren und eine P-Cadherin-Expression wie die gesunden, oralen Keratinozyten aufwiesen, zeigten nach P-Cadherin-Knockdown keine Veränderung in der K1/10-Expression. Experimente mit siRNA gegen E-Cadherin bestätigten, dass die induzierte K1/10-Expression P-Cadherin-spezifisch ist.

Als weiterer Beweis für die Beteiligung von P-Cadherin an der Keratinozyten-differenzierung zeigten FACS-Analysen, dass sich der Verlust von P-Cadherin negativ auf die Proliferation von gesunden, undifferenzierten Keratinozyten aus der oralen Mukosa auswirkte. Der zusätzliche Knockdown von C/EBP-beta, einem bekannten Transkriptionsfaktor für Keratine in Keratinozyten, hob in gesunden, oralen Keratinozyten diesen verzögerten Proliferationseffekt wieder auf, was beweist,

dass P-Cadherin über C/EBP-beta die Differenzierung der gesunden oralen Keratinozyten kontrolliert.

## 5 Diskussion

In basalen und suprabasalen Zellschichten der oralen Mukosa sorgt P-Cadherin als Adhäsionsprotein durch Ausbildung homophiler Cadherin-Cadherin-Interaktionen für interzelluläre Adhäsion. Im oralen Plattenepithelkarzinom kommt es jedoch an der Invasionsfront aufgrund der Abnahme von membranständigem P-Cadherin zum Verlust der Zell-Zell-Verbindungen, wodurch die Mobilität der invasiven Tumorzellen erhöht und das Auswandern der oralen Plattenepithelkarzinomzellen erleichtert wird. Um Einblicke in die Rolle von P-Cadherin während der OSCC-Progression zu erhalten, sind daher im Rahmen dieser Dissertation zunächst die molekularen Auswirkungen einer induzierten P-Cadherin-Expression in einer Cadherin-defizienten OSCC-Zelllinie untersucht worden. Der erste Teil dieser Dissertation konzentrierte sich dabei auf den Einfluss von P-Cadherin auf den Wnt-verwandten GSK3-beta-Signalweg. Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde die Wirkung von P-Cadherin auf den die Migration regulierenden Slit/Robo-Signalweg eingehend analysiert. Um Einblick in die spezifische Rolle von P-Cadherin bei der Differenzierung von Keratinozyten zu gewinnen, wurde im dritten Teil dieser Dissertation der Einfluss von P-Cadherin auf die Keratin-Expression in gesunden, oralen Keratinozyten untersucht.

### 5.1 P-Cadherin und der GSK3-beta/Snail-Signalweg

Aufgrund der induzierten P-Cadherin-Expression in einer undifferenzierten, Cadherin-defizienten OSCC-Zelllinie reversionierten die Karzinomzellen von einem mesenchymalen in einen Epithel-ähnlichen Phänotyp. Diese Änderung der Morphologie ist ein Zeichen dafür, dass P-Cadherin zum einen durch Ausbildung von Cadherin-Cadherin-Interaktionen selbst und zum anderen durch Beeinflussung von verschiedenen Signalwegen zur Reversionierung dieser Zellen beiträgt. Dass Cadherine die Zellmorphologie beeinflussen, ist in der Literatur hinreichend bekannt. So beobachteten Yokoyama *et al.* in einer OSCC-Zelllinie infolge induzierter E-Cadherin-Expression eine Veränderung der Zellform (Yokoyama *et al.*, 2001). Takkunen *et al.* bestätigten ebenfalls die von der Cadherin-Expression induzierte Morphologieänderung in OSCC-Zelllinien. Während OSCC-Zellen aus dem Primärtumor, welche E-Cadherin exprimierten, die typische Form von Epithelzellen zeigten, wiesen Zellen

aus dem wiederkehrenden Tumor neben dem Verlust der E-Cadherin-Expression auch den charakteristischen Phänotyp von dedifferenzierten, mesenchymalen Zellen auf (Takkunen *et al.*, 2006).

Ein weiterer Hinweis auf die teilweise Reversion der EMT in der OSCC-Zelllinie PCI52 ist die veränderte Expression und Lokalisation von einigen EMT-Markern nach P-Cadherin-Expression. Interessanterweise bedingte die Expression von P-Cadherin in unseren OSCC-Zelllinien auch eine Re-Expression von E-Cadherin. So führte die induzierte P-Cadherin-Expression zur zytoplasmatischen Translokation von Snail, dem Repressor von E-Cadherin. In Folge dessen wurde E-Cadherin in diesen OSCC-Zellen wieder exprimiert. Der *in vitro* entdeckte Zusammenhang zwischen der P-Cadherin-Expression und der Snail-Lokalisation ist auch *in vivo* an OSCC-Paraffinschnitten beobachtet worden. Immunhistologische Färbungen zeigten an der Invasionsfront des OSCC eine reduzierte P-Cadherin-Expression, welche mit einer schwachen Differenzierung der malignen Keratinozyten und einer schlechten Überlebensrate assoziiert ist (Lo Muzio *et al.*, 2004) (Lo Muzio *et al.*, 2005) (Munoz-Guerra *et al.*, 2005). Gleichzeitig konnte an der Invasionsfront des OSCC eine starke, nukleäre Snail-Färbung beobachtet werden. Es ist allgemein bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der EMT sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch während der Tumorprogression spielt (Nieto, 2002). Snail bindet bekanntlich an E-Boxen im E-Cadherin-Promotor und reprimiert die Transkription dieses Adhäsionsproteins (Battle *et al.*, 2000). Der daraus resultierende Verlust der E-Cadherin-Expression führt im Epithel zur Lockerung der Zell-Zell-Adhäsion und zur Transition epithelilaler Keratinozyten in Zellen mit migratorischem Phänotyp. Lyons *et al.* bestätigten, dass Snail zur Entstehung des OSCC beiträgt. Sie zeigten, dass dieser Transkriptionsfaktor u. a. die Differenzierung oraler Keratinozyten verhindert, indem Faktoren, die für die terminale Differenzierung der Keratinozyten verantwortlich sind, reprimiert werden. Desweiteren initiiert Snail in oralen Karzinomzellen die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, welche wiederum die Tumorprogression fördern (Lyons *et al.*, 2008).

Entscheidend für die maligne Wirkung von Snail in Karzinomzellen ist die Lokalisation des Transkriptionsfaktors. Diese hängt vom Phosphorylierungszustand dieses Proteins ab. Snail wird als Substrat von GSK3-beta zweimal von dieser Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert. Die erste Phosphorylierung führt zur subzellulären Lokalisation, die zweite Phosphorylierung zur  $\beta$ TrCP-vermittelten Ubi-

quitinierung (Schlessinger und Hall, 2004) (Zhou *et al.*, 2004). Die unterschiedliche Snail-Lokalisation der P-Cadherin defizienten und P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen ist vermutlich von der unterschiedlichen GSK3-beta-Aktivität abhängig. Die P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen besitzen, ebenso wie die gesunden, oralen Keratinozyten, aktives GSK3-beta, welches Snail sowohl im Kern als auch im Zytoplasma kontinuierlich phosphoryliert (Doble und Woodgett, 2003). Im Gegensatz dazu liegt in den P-Cadherin defizienten OSCC-Zellen eine inaktive Serin/Threonin-Kinase vor. Durch inaktives GSK3-beta, hervorgerufen durch phosphoryliertes Serin-9, bleibt Snail im Zellkern und fördert dort durch Reprimierung von E-Cadherin und durch Aktivierung mesenchymaler Gene die Aufrechterhaltung eines Fibroblasten-ähnlichen Phänotyps in den OSCC-Zellen. Neben dieser Serin-9 phosphorylierten Serin/Threonin-Kinase im OSCC berichten zahlreiche Publikationen von inaktivem GSK3-beta und daraus resultierenden, stabilen GSK3-beta-Substraten bei der Progression verschiedener Tumore. So sorgt GSK3-beta neben Snail und beta-Catenin auch für die Degradierung des Prolaktin-Rezeptors. Im Mammakarzinom wird dieser Rezeptor jedoch aufgrund von inaktivem GSK3-beta nicht phosphoryliert und degradiert. Dadurch kommt es durch kontinuierliche Stimulierung dieses Rezeptors durch den Liganden Prolaktin zur Tumorprogression (Plotnikov *et al.*, 2008). Auch sowohl in *in vitro*-Experimenten mit Prostatakarzinomzelllinien als auch in einem in transgenen Mäusen ausgelösten Prostatakarzinom wurde phosphoryliertes GSK3-beta nachgewiesen. Dies führte neben erhöhtem Snail-Level u. a. auch zu einer verstärkten Cyclin D1-Expression, welche wiederum die Proliferation der Karzinomzellen verstärkte (El Touny und Banerjee, 2007). Wang *et al.* zeigten zudem in einem Subtyp des Kolorektaltumors, dass ein signifikant erhöhter beta-Catenin-Level, ausgelöst durch inaktives GSK3-beta, an der Kanzerogenese beteiligt ist (Wang *et al.*, 2009). Die übergeordneten Faktoren, die für die GSK3-beta-Phosphorylierung im OSCC verantwortlich sind, sind noch unbekannt. Man kennt jedoch verschiedene Kinasen, welche, abhängig vom Zelltyp und von verschiedenen Regulatoren, GSK3-beta am N-terminalen Serin-9 phosphorylieren (Fang *et al.*, 2000) (Cross *et al.*, 1995) (Stambolic und Woodgett, 1994). In OSCC-Zellen scheint bei der GSK3-beta-Phosphorylierung Proteinkinase B/Akt eine wichtige Rolle zu spielen. So führte die Inhibierung von Akt in OSCC-Zellen zur Revertierung der EMT und zur Re-Expression von E-Cadherin (Hong *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Daten könnte Akt für die GSK3-beta-Phosphorylierung in den in

dieser Arbeit verwendeten OSCC-Zellen verantwortlich und damit ein übergeordneter Faktor in der P-Cadherin-vermittelten GSK3-beta-Aktivierung sein.

Aktuelle Literatur beschreibt Snail als Repressor von E-Cadherin (Cano *et al.*, 2000). Diesen reprimierenden Effekt von Snail bestätigten auch Batlle *et al.* In Tumoren epithelialen Ursprungs beobachteten sie, dass Snail an E-Boxen im E-Cadherin-Promotor bindet und dessen Transkription verhindert (Batlle *et al.*, 2000). Auch Yokoyama *et al.* berichteten von einer inversen Korrelation zwischen E-Cadherin und Snail in OSCC-Zellen (Yokoyama *et al.*, 2001). Neben der Snail-vermittelten Inhibierung der E-Cadherin-Expression führt auch die Methylierung des E-Cadherin-Promotors zu einer ausbleibenden E-Cadherin-Expression. In bis zu 85% der oralen Tumore ist der Verlust der E-Cadherin-Expression auf Promotormethylierung zurückzuführen (Ha und Califano, 2006). Untersuchungen des E-Cadherin-Promotors zeigten jedoch sowohl in den P-Cadherin defizienten als auch in den P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen keine Methylierung im E-Cadherin-Promotor. Dies bestätigt, dass die beobachtete Re-Expression von E-Cadherin nicht aufgrund von Promotordemethylierung, sondern aufgrund der zytoplasmatischen Snail-Translokation zustande kommt.

Auf die induzierte Expression von Snail in P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen folgte die Abnahme von E-Cadherin auf Protein-Ebene. Dieses Ergebnis bestätigt wiederum den Zusammenhang der Snail-Translokation und der E-Cadherin-Re-Expression in den P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen. Interessanterweise konnte man neben der reduzierten E-Cadherin-Expression in diesen Snail und P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen trunkiertes E-Cadherin im Zelllysate entdecken. Verschiedene Proteasen, wie z. B. Matrixmetalloproteasen (MMP) oder ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinases*), können in unseren OSCC-Zellen für diese Trunkierung verantwortlich sein. MMPs, eine Gruppe von Enzymen, welche die extrazelluläre Matrix degradieren, spielen aufgrund ihrer proteolytischen Eigenschaften besonders bei der Tumordinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle. Im OSCC findet man eine verstärkte Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 (Erdem *et al.*, 2007) (Jordan *et al.*, 2004) (Katayama *et al.*, 2004). Die Expression einiger dieser MMPs wird von Snail induziert, was zeigt, dass der GSK3-beta-vermittelte Signalweg auch bei der Invasion oraler Tumore von Bedeutung ist. So berichteten Yokoyama *et al.*, dass die Snail induzierte Expression von MMP-2 die Invasion von OSCC-Zelllinien fördert (Yokoyama *et al.*, 2003). Sun *et al.* zeigten

zudem, dass ein im OSCC erhöhter TGF-beta-Level die Expression des EMT-Markers Snail induziert, infolge dessen die Expression von MMP-9 anstieg (Sun *et al.*, 2008). Neben MMP-2 und MMP-9 könnte aber auch MMP-7 für die Trunkierung von E-Cadherin verantwortlich sein, denn im verletzten Lungenepithel vermittelte MMP-7 die Abspaltung der E-Cadherin-Ektodomäne und in Lungenkarzinomzellen förderte Snail die Expression von MMP-7 (McGuire *et al.*, 2003) (Miyoshi *et al.*, 2004). Neben den MMPs könnten aber auch ADAMs bei der Trunkierung von E-Cadherin eine Rolle spielen. In Brustkrebszellen katalysierte z. B. ADAM-15 die Abspaltung der E-Cadherin-Ektodomäne (Najy *et al.*, 2008) und in Fibroblasten und Keratinozyten vermittelte ADAM-10 die Trunkierung von E-Cadherin (Maretzky *et al.*, 2005). Weiterführende Studien sind jedoch nötig, um zu zeigen, auf welche Weise Snail tatsächlich auf Proteasen im OSCC und somit auf die Trunkierung von E-Cadherin Einfluss nimmt.

## 5.2 P-Cadherin und der Slit/Robo-Signalweg

Neben der Änderung der Morphologie sowie der Expression verschiedener EMT-Marker beeinflusste die induzierte P-Cadherin-Expression in der untersuchten OSCC-Zelllinie auch die Migration dieser Karzinomzellen. Die Bildung von P-Cadherin/Robo-3-Komplexen – verstärkt durch den Robo-3-Rezeptor-Liganden Slit-2 – reduzierte zum einen die Migration der OSCC-Zellen und induzierte zum anderen die Expression und Sekretion des Liganden Slit-2.

Immunhistologische Färbungen zeigten, dass Slit-2, ebenso wie P-Cadherin, in den basalen und suprabasalen Zellschichten der oralen Mukosa exprimiert wird. Als anti-inflammatorischer Faktor reguliert Slit-2 dort die Migration von Zellen des Immunsystems (Wu *et al.*, 2001) (Guan *et al.*, 2003). So berichteten Wu *et al.*, dass Slit-2 im Epithel die Chemotaxis von Leukozyten, welche durch Chemokine induziert worden ist, inhibieren kann (Wu *et al.*, 2001). Die Migration von Langerhans-Zellen, welche man oberhalb der Basalzellschicht proliferierender Keratinozyten findet, wird ebenfalls durch Slit-2 gehemmt. Bei Kontakt mit Allergenen schützt das in der Haut aktivierte Slit-2 vor einer übertriebenen Immunantwort, indem es die Wanderung der Allergen präsentierenden Langerhans-Zellen in periphere Lymphorgane und somit die Induktion einer Immunantwort verhindert (Guan *et al.*, 2003).



Im Vergleich zur gesunden, oralen Mukosa verändert sich die Expression und Lokalisation von Slit-2 jedoch während der Tumorprogression. Sowohl im Anfangsstadium (Dysplasie) als auch im fortgeschrittenen Stadium kann man im OSCC eine schwache Slit-2-Expression und eine diffuse Slit-2-Lokalisation beobachten. Neben der reduzierten Slit-2-Expression im gesamten OSCC kann man nur um Blutgefäße stark exprimiertes Slit-2 erkennen (Daten nicht gezeigt). Wang *et al.* bewiesen den beobachteten Zusammenhang zwischen dem Slit/Robo-Signalweg und der Tumorangiogenese. Sie zeigten, dass das von verschiedenen Tumoren exprimierte Slit-2 vaskuläre Endothelzellen anlockt und über den Robo/Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg die Bildung von Blutgefäßen fördert (Wang *et al.*, 2003).

Neben der oralen Mukosa exprimiert auch die Mukosa der Speiseröhre Slit-2. Kim *et al.* detektierten dieses Glykoprotein mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung in der gesunden Speiseröhre, während sie im ösophagealen Plattenepithelkarzinom eine reduzierte Slit-2-Expression feststellten (Kim *et al.*, 2008). In zahlreichen weiteren Tumoren ist diese reduzierte Slit-2-Expression ebenfalls festgestellt worden (Yiin *et al.*, 2009) (Prasad *et al.*, 2008) (Tseng *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Beobachtungen werden Slit-2 tumorsuppressive Eigenschaften zugeschrieben.

Die gleiche Lokalisation von P-Cadherin und Slit-2 in der oralen Mukosa sowie der auffällige Verlust beider Proteine im OSCC deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von P-Cadherin und Slit-2 hin. Ein Signalweg, der diese beiden Proteine eventuell miteinander verbindet, ist der Wnt-Signalweg. P-Cadherin aktiviert, möglicherweise über den Akt-Signalweg, die Serin/Threonin-Kinase GSK3-beta (Bauer *et al.*, 2009), wodurch der Transkriptionsfaktor beta-Catenin durch den Multienzymkomplex, bestehend aus GSK3-beta, APC und Axin, phosphoryliert und anschließend degradiert wird. Publikationen von Tseng *et al.* und Prasad *et al.* zeigten, dass Slit-2 seine tumorsuppressiven Effekte durch Regulierung des Transkriptionsfaktors beta-Catenin ausübt (Tseng *et al.*, 2010) (Prasad *et al.*, 2008). Auch einige Versuche in dieser Dissertation weisen auf eine Beteiligung von Slit-2 am Wnt-Signalweg hin. In OSCC-Zellen, die wenig aktives GSK3-beta und somit stabiles beta-Catenin besitzen, führt die Inkubation von Slit-2 zur transienten Phosphorylierung von beta-Catenin. Über einen noch unbekannten Mechanismus wird in den OSCC-Zellen nach Bindung von Slit-2 an seinen Robo-Rezeptor wahrscheinlich der GSK3-beta/APC/Axin-Komplex aktiviert, in Folge dessen es zur Phosphorylierung von beta-Catenin kommt (Abbildung 41A). In Lungenkarzinomzellen nimmt Slit-2

ebenfalls Einfluss auf den Wnt-Signalweg. Slit-2 aktiviert über den Akt-Signalweg GSK3-beta, woraufhin es zur Phosphorylierung und Degradierung von beta-Catenin kommt (Tseng *et al.*, 2010). Prasad *et al.* beobachteten in Slit-2-überexprimierenden Brustkrebszellen eine verstärkte Ubiquitinierung von beta-Catenin. Die Slit-2-vermittelte Hemmung der Akt-Aktivität resultiert in diesen Zellen in einer Aktivierung von GSK3-beta und somit in einer verstärkten beta-Catenin-Degradierung (Prasad *et al.*, 2008).

Neben der Involvierung von Slit-2 an der Degradierung von beta-Catenin beeinflusst auch beta-Catenin die Expression von Slit-2. Verhindert man im Zellkern die Bindung von beta-Catenin an die Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf, so kommt es zu einer Re-Expression von Slit-2 in Slit-2-defizienten OSCC-Zellen. Normalerweise würde man nach Blockierung des beta-Catenin/Lef/Tcf-Komplexes eine reduzierte Genexpression erwarten. In erst kürzlich erschienenen Publikationen von Blauwkamp *et al.* und Hoverter und Waterman wird jedoch berichtet, dass die Expression von Genen von der Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren abhängt (Blauwkamp *et al.*, 2008) (Hoverter und Waterman, 2008). Daraus lässt sich schließen, dass neben beta-Catenin, Lef und Tcf weitere Transkriptionsfaktoren für die Slit-2-Expression notwendig sind.

Darüber hinaus deuten unsere Daten darauf hin, dass Slit-2 in einem *Feedback-Loop* seine eigene Transkription unterstützt. Ein hypothetisches Model dieses P-Cadherin/Slit-2-Signalwegs zeigt Abbildung 41A. P-Cadherin fördert auf noch unbekannte Art und Weise die Sekretion von Slit-2. Dieses sezernierte Slit-2 induziert nach Bindung an seinen Rezeptor die Phosphorylierung von beta-Catenin, woraufhin dieser Transkriptionsfaktor degradiert. Aufgrund von fehlendem beta-Catenin steigt wiederum die Slit-2-Expression und -Sekretion.

Neben der Expression von Slit-2 reguliert P-Cadherin auch, durch Interaktion mit dem Rezeptor Robo-3, die Migration der OSCC-Zellen. Die induzierte Expression von P-Cadherin in Cadherin-defizienten OSCC-Zellen hemmte in Boydenkammer-Migrationsversuchen die Wanderung dieser Karzinomzellen. Zusätzliche Slit-2-Behandlung führte interessanterweise nur in den P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen zu einer weiteren Verlangsamung der Zellmigration. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass P-Cadherin zusammen mit Slit-2 und seinem Rezeptor Robo-3 einen Komplex bildet, der die Migration der Karzinomzellen verhindert. *In vivo* könnte P-Cadherin neben der Ausbildung von P-Cadherin-P-Cadherin-Interaktionen durch

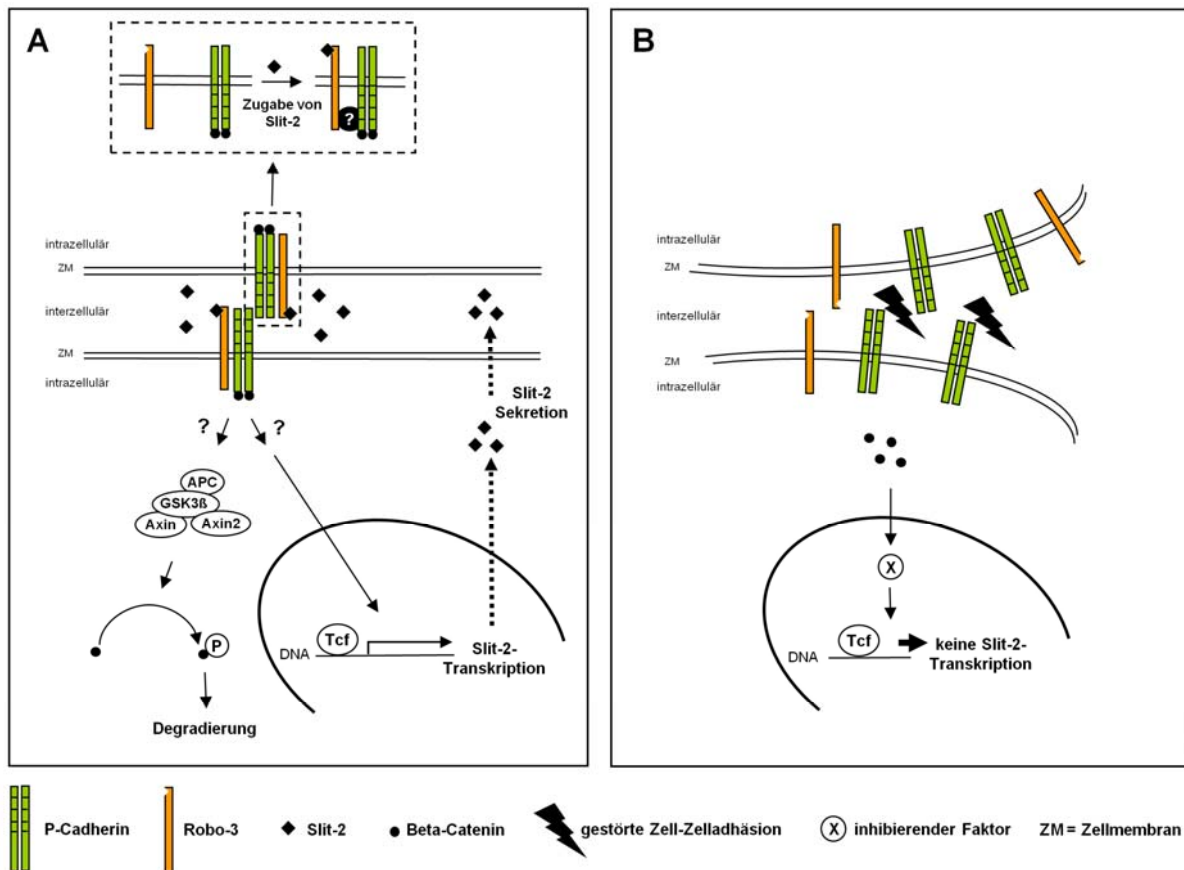


Abbildung 41

#### Hypothetisches Modell der Slit-2-induzierten P-Cadherin/Robo-3-Komplexbildung und der anschließenden Effekte auf die Slit-2-Transkription und -Sekretion.

Die Aktivierung von Robo-3 durch Slit-2 resultiert in der Bildung eines Komplexes zwischen Robo-3 und P-Cadherin, der über noch unbekannte Proteine vermittelt wird (**A**, kleines Bild). Extrazelluläres Slit-2 bindet an den Robo-3-Rezeptor. Daraufhin wird das zytosolische beta-Catenin phosphoryliert und degradiert. In Folge dessen können weitere inhibitorische Transkriptionsfaktoren nicht mehr exprimiert werden, was die Slit-2-Transkription in einem Feedback-Loop unterstützt. Zusätzlich bewirken P-Cadherin-P-Cadherin-Interaktionen die Expression von Slit-2 und erleichtern die Sekretion von Slit-2 (**A**). Auf der anderen Seite führt die Auflösung der P-Cadherin-P-Cadherin-Interaktionen zu einer verminderten Sekretion von Slit-2 und zu einer Abnahme der P-Cadherin/Robo-3-Interaktionen. Aufgrund der zerstörten Zell-Zelladhäsion und der verminderten Slit-2-Sekretion wird beta-Catenin vermutlich durch GSK3-beta-Inaktivierung nicht mehr phosphoryliert. Dadurch wird beta-Catenin in den Zellkern transportiert und aktiviert dort Gene, die wiederum an der Inhibition der Slit-2-Expression beteiligt sind (**B**) (aus Bauer *et al.*, 2011).

Bildung von P-Cadherin/Slit-2/Robo-3-Komplexen die Zelladhäsion der basalen und suprabasalen Keratinozyten unterstützen und somit zur Aufrechterhaltung der epithelialen Architektur beitragen. In verschiedenen Tumorarten ist ebenfalls ein anti-migratorischer Effekt von Slit-2 auf Karzinomzellen beobachtet worden. In *in vitro*-Versuchen inhibierte Slit-2 z. B. die Invasion von Medulloblastomzellen, indem es die Aktivität von dem Rho-GTPase-Protein Cdc42, welches für die Ausbildung von migrationsfördernden Filopodien beteiligt ist, hemmte (Werbowetski-Ogilvie *et al.*,

2006). Die Migration von Gliomazellen *in vitro* wird ebenfalls über Slit-2 durch Abschwächung der Cdc42-Aktivität gehemmt (Yiin *et al.*, 2009). Exogenes Slit-2 inhibierte auch die Migration, Chemoinvasion und Adhäsion von CXCL12-induzierten Brustkrebszellen. Durch die Behandlung der Karzinomzellen mit Slit-2 wurden Komponenten des Fokal-Adhäsions-Komplexes, welche für die Zellbewegung notwendig sind, so moduliert, dass die Zellmigration und Chemotaxis gehemmt wurde (Prasad *et al.*, 2004). Slit-2 beeinflusst auch die Migration von nicht-karzinogenen Zellen. Die durch Chemokine ausgelöste, gerichtete Chemotaxis von Leukozyten wird durch den Repulsionsfaktor Slit-2 inhibiert (Wu *et al.*, 2001). Wie oben beschrieben hemmt Slit-2 im adaptiven Immunsystem die Wanderung der Allergen präsentierenden Langerhans-Zellen und verhindert somit die Induktion einer Immunantwort (Guan *et al.*, 2003).

In P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen interagierte P-Cadherin mit dem Robo-3-Rezeptor und verlangsamte dadurch die Wanderung dieser Karzinomzellen im Vergleich zu den P-Cadherin defizienten OSCC-Zellen. Zusätzliche Inkubation mit Slit-2 verstärkte die inhibierende Wirkung des P-Cadherin/Robo-3-Komplexes. Dieser inhibierende Effekt wurde jedoch durch das Ausschalten von Robo-3 aufgehoben, was zeigt, dass der Slit/Robo-Signalweg auch in Keratinozyten zur Regulierung der Migration beiträgt. In Experimenten mit Gliomazelllinien beobachteten Mertsch *et al.* dieselbe Wirkung von Slit und Robo. Der durch Slit-2 ausgelöste repulsive Migrationseffekt wurde durch das Ausschalten des Robo-1-Rezeptors ebenfalls neutralisiert (Mertsch *et al.*, 2008).

In P-Cadherin induzierten OSCC-Zellen verstärkte Slit-2 die Interaktion von P-Cadherin mit dem Rezeptor Robo-3, wodurch die Wanderung dieser Zellen auf einen Lockstoff hin verhindert wird. Der Mechanismus, der zu diesem Wanderungsstopp in den OSCC-Zellen führt, ist noch nicht bekannt. Einen möglichen Slit/Robo/Cadherin-Signalweg zeigten Rhee *et al.* In neuronalen Retinazellen aus dem Kücken bildet sich nach Robo-2-Aktivierung durch Slit ein Komplex aus Robo-2, der Tyrosinkinase Abl, Cables (ein Abl-Substrat) und N-Cadherin. Cables verbindet dabei das Robo-assoziierte Abl mit dem N-Cadherin-assoziierten beta-Catenin. Nach der Aktivierung von Abl durch Cables phosphoryliert Abl beta-Catenin, was zur Ablösung von beta-Catenin von N-Cadherin und somit zur Schwächung der Zelladhäsion führt (Rhee *et al.*, 2002) (Rhee *et al.*, 2007). Sowohl in den P-Cadherin exprimierenden als auch in den P-Cadherin defizienten OSCC-Zelllinien wurde eine

Interaktion von Abl mit der intrazellulären Robo-3-Domäne bereits nachgewiesen. Ob und auf welche Weise P-Cadherin mit diesem Abl/Robo-3-Komplex verbunden ist, ist in weiteren Experimenten zu klären. Im Gegensatz zu der negativen Regulation der N-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bei Rhee *et al.* zeigte sich in den P-Cadherin induzierten OSCC-Zellen, dass sich Slit-2 und Robo-3 positiv auf die Cadherin-vermittelte Adhäsion auswirkten. Auch Shiau *et al.* berichteten von einem positiven Effekt des Slit/Robo-Signalwegs auf Cadherine. Während der kranialen Gangliogenese im Kücken verstärkt Slit-1 zusammen mit Robo-2 die adhäsive Wirkung von N-Cadherin in sensorischen Neuronen (Shiau und Bronner-Fraser, 2009). Möglicherweise sind bei diesem Prozess kleine Rho-GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) involviert, welche Signale sowohl von Cadherinen als auch von den Robo-Rezeptoren ins Zellinnere weiterleiten. Da die Slit- und Robo-Proteine in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen sowohl repulsiven als auch attraktiven Einfluss auf die Migration haben, können die Slit-Liganden zusammen mit ihren Rezeptoren positiv wie auch negativ auf die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion wirken.

### **5.3 P-Cadherin und die Regulation der Keratin-1- und Keratin-10-Expression**

Der dritte Teil dieser Dissertation konzentrierte sich auf den Einfluss von P-Cadherin auf die Differenzierung primärer, oraler Keratinozyten. *In-vitro*-Experimente zeigten, dass der Verlust der P-Cadherin-Expression zur verstärkten Expression der Differenzierungsmarker K1 und K10 in gesunden, primären, oralen Keratinozyten führte. In Keratinozyten, isoliert aus solider OSCC-Primärtumormasse mit einer relativ hohen P-Cadherin-Expression, konnte diese K1/10-Expression-Regulierung nicht beobachtet werden.

Laut Literatur sorgen Cadherine als Zelladhäsionsmoleküle nicht nur für die Aufrechterhaltung der epithelialen Architektur, sondern regulieren neben vielen Aspekten auch die Differenzierung von Zellen (Halbleib und Nelson, 2006). Es ist bereits bekannt, dass Cadherine die Expression einiger wichtiger Differenzierungsmarker beeinflussen. So berichteten Hodivala und Watt, dass P-Cadherin zusammen mit E-Cadherin während der terminalen Differenzierung bei der Expression von Integrinen eine Rolle spielen (Hodivala und Watt, 1994). Integrine, welche die

proliferativen Keratinozyten mit der Basalmembran verankern, werden nur in basalen Keratinozyten exprimiert. Steigt die Calciumkonzentration, so nimmt die Integrin-Expression ab. Wird jedoch bei hoher Calciumkonzentration die Funktion von P- und E-Cadherin mit Antikörpern gleichzeitig blockiert, so nimmt die Integrin-Expression wieder zu. Hodivala und Watt schlossen daraus, dass sowohl P- als auch E-Cadherin zusammen mit weiteren Faktoren zur terminalen Differenzierung der Keratinozyten beitragen und die Expression der Integrine negativ beeinflussen können (Hodivala, 1994). Schon Zhu und Watt bewiesen, dass Cadherine an der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten beteiligt sind. Die Expression von dominant-negativem E-Cadherin, welches nur aus der transmembranen und zytoplasmatischen Domäne bestand, hatte in gesunden, humanen, epidermalen Keratinozyten einen inhibitorischen Effekt auf die Keratinozytenproliferation. Gleichzeitig wurde aufgrund des mutierten E-Cadherins die terminale Differenzierung der Keratinozyten stimuliert (Zhu und Watt, 1996). Auch Hines *et al.* berichteten in einer Studie, dass die Inhibierung der Cadherin-Funktion mit Hilfe von Cadherin-blockierenden-Antikörpern gegen E- und P-Cadherin die Expression von verschiedenen Differenzierungsmarkern, wie z. B. Transglutaminase 1, Loricrin und Profilaggrin, in humanen Keratinozyten beeinflussen konnte (Hines *et al.*, 1999).

Im Epithel beginnt die Differenzierung, sobald die Keratinozyten die proliferierende Basalzellschicht verlassen (Fuchs und Green, 1980). Interessanterweise wird P-Cadherin gerade in diesen Zellschichten exprimiert (Munoz-Guerra *et al.*, 2005) (Lo Muzio *et al.*, 2004), was auf eine Beteiligung an der Proliferation bzw. Differenzierung der Keratinozyten hinweist. Einen detaillierten Einblick in die Funktion von P-Cadherin auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen wiesen Radice *et al.* nach (Radice *et al.*, 1997). Mit Hilfe von P-Cadherin-Knockout-Mäusen versuchten Radice *et al.*, die Rolle dieses Adhäsionsproteins *in vivo* zu klären. Dabei beobachteten sie, dass der Verlust von P-Cadherin in weiblichen Mäusen zur frühzeitigen Differenzierung der Brustdrüsen führt. P-Cadherin wird dort normalerweise von Myoepithelzellen, welche die luminalen Epithelzellen der Brustdrüse umgeben, exprimiert. Aufgrund dieses Ergebnisses vermuteten Radice *et al.*, dass entweder die P-Cadherin-vermittelte Adhäsion selbst oder Signale, welche durch diese Zell-Zell-Interaktionen entstehen, die Entwicklung der Brustdrüse negativ beeinflussen. Mit diesem Knockout-Experiment bestätigten Radice *et al.*, dass P-Cadherin neben der Aufrechterhaltung der epithelialen Architektur ebenso zur

Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustandes der Brustdrüse dient. Übereinstimmend mit diesen Daten zeigten unsere durchflusszytometrischen Analysen mit primären, gesunden Keratinozyten aus der oralen Mukosa, dass die Reduktion der P-Cadherin-mRNA-Expression zur Verzögerung der Proliferation führte. Die reduzierte P-Cadherin-mRNA-Expression in Keratinozyten, welche aus primären OSCC isoliert worden waren, hatte interessanterweise den gegenteiligen Effekt auf die Zellproliferation verglichen mit gesunden, oralen Keratinozyten mit reduzierter P-Cadherin-Expression. Die induzierte Proliferation weist auf einen deregulierten P-Cadherin-Signalweg in den OSCC-Zellen hin. In gesunden, oralen Keratinozyten führte zwar die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch GSK3-beta-Inhibierung zur Reduzierung der K1/10-Expression, war jedoch nicht an der induzierten K1/10-Expression nach P-Cadherin-Knockdown beteiligt. In Keratinozyten aus dem OSCC-Gewebe scheint weder die Reduzierung der P-Cadherin-Expression noch die Modulation des Wnt-Signalwegs Auswirkungen auf die K1/10-Expression zu haben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits zu Beginn der OSCC-Entstehung der Wnt-Signalweg dereguliert ist. So berichteten Sogabe *et al.* von einem aktivierten Wnt-Signalweg, welcher bei der OSCC-Entwicklung eine bedeutende Rolle spielt. Sie beobachteten, dass die Gene für die sezernierten Frizzled-verwandten Proteine, welche als Wnt-Inhibitoren diesen Signalweg blockieren, häufig epigenetisch inaktiviert waren. Der Verlust dieser, den Wnt-Signalweg kontrollierender Proteine führte über die Aktivierung des Wnt-*Signalings* zur verstärkten Zellproliferation während der oralen Karzinogenese (Sogabe *et al.*, 2008). Auch Zhang *et al.* erwähnten in einer Publikation den Zusammenhang zwischen dereguliertem Wnt-*Signaling* und OSCC-Karzinogenese. Immunohistochemische Analysen wiesen auf eine Assoziation zwischen der verstärkten Expression von Wnt-1, ein Ligand des Wnt-Signalwegs, und der erhöhten beta-Catenin-Expression hin, was ihrer Meinung nach eine wichtige Rolle bei der unkontrollierten Proliferation während der OSCC-Entstehung spielt (Zhang *et al.*, 2005). Aufgrund dieser bereits bekannten Deregulation des Wnt-Signalwegs im OSCC lassen unsere Ergebnisse mit den isolierten OSCC-Keratinozyten daher vermuten, dass trotz relativ hoher P-Cadherin-Expression im Primärtumor dieses Adhäsionsprotein nicht mehr in der Lage ist, die K1/10-Expression und damit die Differenzierung zu regulieren.

Laut Literatur steuern verschiedene Transkriptionsfaktoren durch Bindung an DNA-Bindestelle im Promotor die Expression der Keratin-Gene. Zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Keratin-Expression zählen Sp1 (*specificity protein 1*), AP-1 (*activating protein-1*) und AP-2 (*activating protein-2*) sowie die nukleären Rezeptoren für Retinsäure und für thyreoidale Hormone. Zusätzlich kann die Keratin-Expression durch extrazelluläre Signale, wie z. B. Wachstumsfaktoren, reguliert werden (Blumenberg, 2006) (Fuchs und Green, 1980). Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien haben jedoch gezeigt, dass Calcium der Hauptmodulator der Differenzierung ist. Ein Calciumgradient im Epithel - geringe Calciumkonzentration in den basalen Zellschichten und höhere Calciumkonzentrationen in den suprabasalen Zellschichten - reguliert die Expression verschiedener Differenzierungsproteine (z. B. Keratine, Involucrin, Loricrin) (Eckert *et al.*, 1997). Auf diese Weise bewahren Keratinozyten *in vitro* ihre proliferativen Fähigkeiten, wenn sie in Medium mit geringer Calciumkonzentration (<0,1 mM Calciumchlorid) kultiviert werden. Eine Erhöhung der Calciumkonzentration löst in diesen Keratinozyten die terminale Differenzierung aus (Eckert *et al.*, 1997). Auch die Expression von K1/10, beides typische Differenzierungsmarker der suprabasalen Keratinozyten, kann durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration in kultivierten Keratinozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene induziert werden (Yuspa *et al.*, 1989). Unsere *in vitro*-Experimente bewiesen jedoch, dass die Expression von K1/10 in primären, oralen Keratinozyten, welche in Medium mit geringer Calciumkonzentration kultiviert wurden, allein durch den Expressionsstatus von P-Cadherin reguliert werden konnte. Während der Kultivierung der Keratinozyten in Medium mit geringer Calciumkonzentration ist P-Cadherin kaum in der Zellmembran, sondern größtenteils im Zytoplasma lokalisiert; demnach ist P-Cadherin hier noch nicht bzw. sehr wenig an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Erst eine Erhöhung der Calciumkonzentration führt in Keratinozyten zur membranständigen Lokalisation von P-Cadherin und zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Braga *et al.*, 1995). Demzufolge deutet die beobachtete Zunahme der K1/10-Expression nach P-Cadherin-Knockdown in primären, oralen Keratinozyten, welche in Medium mit nur 0,06 mM Calciumchlorid kultiviert wurden, darauf hin, dass die Lokalisation von P-Cadherin im Zytoplasma genügt, um die K1/10-Expression zu regulieren.

In dieser Dissertation wurde C/EBP-beta als Induktor der K1/10-Expression nach P-Cadherin-Knockdown in gesunden, oralen Keratinozyten identifiziert. Dieser



Transkriptionsfaktor gilt als einer der wichtigsten Regulatoren der K1/10-Expression. In interfollikulären Keratinozyten wurde C/EBP-beta, sobald die Zellen die Basalschicht verlassen, verstärkt exprimiert. C/EBP-beta verminderte die Zellproliferation und förderte durch DNA-Bindung die Expression von K1 und K10 und somit die terminale Differenzierung (Lopez *et al.*, 2009). Maytin *et al.* berichteten ebenfalls, dass während der Differenzierung von murinen, epidermalen Keratinozyten u. a. C/EBP für die K10-Expression benötigt wird (Maytin *et al.*, 1999). Zusätzlich zur Aktivierung der K1/10-Expression vermuteten Zhu *et al.*, dass C/EBP auch am Wachstumsstop von murinen, epidermalen Keratinozyten beteiligt ist (Zhu *et al.*, 1999). Weiterführende Studien sind jedoch notwendig, um den Signalweg, welcher von P-Cadherin über C/EBP-beta zur Regulierung der K1/10-Expression führt, genauer zu untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andl**, C.D., Rustgi, A.K., 2005. No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biol Ther* 4, 28-31.
- Argiris**, A., Karamouzis, M.V., Raben, D., Ferris, R.L., 2008. Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695-1709.
- Astuti**, D., Da Silva, N.F., Dallol, A., Gentle, D., Martinsson, T., Kogner, P., Grundy, R., Kishida, T., Yao, M., Latif, F., Maher, E.R., 2004. SLIT2 promoter methylation analysis in neuroblastoma, Wilms' tumour and renal cell carcinoma. *British journal of cancer* 90, 515-521.
- Barrandon**, Y., Green, H., 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2302-2306.
- Batlle**, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., Garcia De Herreros, A., 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89.
- Batsakis**, J.G., Suarez, P., el-Naggar, A.K., 1999. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. *Oral Oncol* 35, 354-359.
- Bauer**, K., Dowejko, A., Bosserhoff, A.K., Reichert, T.E., Bauer, R., 2011. Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Carcinogenesis* 32, 935-943.
- Bauer**, K., Dowejko, A., Bosserhoff, A.K., Reichert, T.E., Bauer, R.J., 2009. P-cadherin induces an epithelial-like phenotype in oral squamous cell carcinoma by GSK-3beta-mediated Snail phosphorylation. *Carcinogenesis* 30, 1781-1788.
- Bauer**, R., Dowejko, A., Driemel, O., Bosserhoff, A.K., Reichert, T.E., 2008. Truncated P-cadherin is produced in oral squamous cell carcinoma. *FEBS J* 275, 4198-4210.
- Baylin**, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M., Issa, J.P., 1998. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72, 141-196.
- Blauwkamp**, T.A., Chang, M.V., Cadigan, K.M., 2008. Novel TCF-binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling. *EMBO J* 27, 1436-1446.
- Blumenberg**, M., 2006. *Transcriptional Regulation of Keratin Gene Expression*. Springer.
- Boyden**, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453-466.
- Braga**, V.M., Hodivala, K.J., Watt, F.M., 1995. Calcium-induced changes in distribution and solubility of cadherins, integrins and their associated cytoplasmic proteins in human keratinocytes. *Cell Adhes Commun* 3, 201-215.
- Bragulla**, H.H., Homberger, D.G., 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* 214, 516-559.

- Cano**, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., Nieto, M.A., 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
- Cavallaro**, U., Christofori, G., 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 118-132.
- Charest**, J.L., Jennings, J.M., King, W.P., Kowalczyk, A.P., Garcia, A.J., 2009. Cadherin-mediated cell-cell contact regulates keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 129, 564-572.
- Chedotal**, A., Kerjan, G., Moreau-Fauvarque, C., 2005. The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ* 12, 1044-1056.
- Clevers**, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
- Costello**, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Robertson, G.P., Gao, X., Wright, F.A., Feramisco, J.D., Peltomaki, P., Lang, J.C., Schuller, D.E., Yu, L., Bloomfield, C.D., Caligiuri, M.A., Yates, A., Nishikawa, R., Su Huang, H., Petrelli, N.J., Zhang, X., O'Dorisio, M.S., Held, W.A., Cavenee, W.K., Plass, C., 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24, 132-138.
- Cross**, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Dallol**, A., Da Silva, N.F., Viacava, P., Minna, J.D., Bieche, I., Maher, E.R., Latif, F., 2002. SLIT2, a human homologue of the *Drosophila* Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res* 62, 5874-5880.
- Dallol**, A., Krex, D., Hesson, L., Eng, C., Maher, E.R., Latif, F., 2003a. Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in gliomas. *Oncogene* 22, 4611-4616.
- Dallol**, A., Morton, D., Maher, E.R., Latif, F., 2003b. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 63, 1054-1058.
- Dickson**, B.J., Gilestro, G.F., 2006. Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 651-675.
- Doble**, B.W., Woodgett, J.R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science* 116, 1175-1186.
- Eckert**, R.L., Crish, J.F., Robinson, N.A., 1997. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev* 77, 397-424.
- El Touny**, L.H., Banerjee, P.P., 2007. Akt GSK-3 pathway as a target in genistein-induced inhibition of TRAMP prostate cancer progression toward a poorly differentiated phenotype. *Carcinogenesis* 28, 1710-1717.
- Erdem**, N.F., Carlson, E.R., Gerard, D.A., Ichiki, A.T., 2007. Characterization of 3 oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and/or metastatic potentials. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 1725-1733.

- Fang**, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast, R.C., Jr., Woodgett, J.R., Mills, G.B., 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11960-11965.
- Fuchs**, E., 1988. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *Trends Genet* 4, 277-281.
- Fuchs**, E., Green, H., 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042.
- Fukata**, M., Kaibuchi, K., 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 887-897.
- Guan**, H., Zu, G., Xie, Y., Tang, H., Johnson, M., Xu, X., Kevil, C., Xiong, W.C., Elmets, C., Rao, Y., Wu, J.Y., Xu, H., 2003. Neuronal repellent Slit2 inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses. *J Immunol* 171, 6519-6526.
- Ha**, P.K., Califano, J.A., 2006. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 7, 77-82.
- Halbleib**, J.M., Nelson, W.J., 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20, 3199-3214.
- Handeli**, S., Simon, J.A., 2008. A small-molecule inhibitor of Tcf/beta-catenin signaling down-regulates PPARgamma and PPARdelta activities. *Mol Cancer Ther* 7, 521-529.
- Hardisson**, D., 2003. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260, 502-508.
- Heo**, D.S., Snyderman, C., Gollin, S.M., Pan, S., Walker, E., Deka, R., Barnes, E.L., Johnson, J.T., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., 1989. Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 49, 5167-5175.
- Hinck**, L., 2004. The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. *Dev Cell* 7, 783-793.
- Hines**, M.D., Jin, H.C., Wheelock, M.J., Jensen, P.J. 1999. Inhibition of cadherin function differentially affects markers of terminal differentiation in cultured human keratinocytes. *J Cell Sci.* 112, 4569-79.
- Hodivala**, K.J., Watt, F.M., 1994. Evidence that cadherins play a role in the downregulation of integrin expression that occurs during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol* 124, 589-600.
- Holland**, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280.
- Hong**, K.O., Kim, J.H., Hong, J.S., Yoon, H.J., Lee, J.I., Hong, S.P., Hong, S.D., 2009. Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 28.

- Hotz**, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.J., Hotz, H.G., 2007. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13, 4769-4776.
- Hoverter**, N.P., Waterman, M.L., 2008. A Wnt-fall for gene regulation: repression. *Sci Signal* 1, pe43.
- Hullmann**, M., Kunkel, M., Reichert, T.E., 2010. Diagnostik und Therapie oraler präkanzeröser Läsionen. *Der MKG-Chirurg* 1, 7-15.
- Hunter**, K.D., Parkinson, E.K., Harrison, P.R., 2005. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 127-135.
- Izumi**, K., Inoki, K., Fujimori, Y., Marcelo, C.L., Feinberg, S.E., 2009. Pharmacological retention of oral mucosa progenitor/stem cells. *J Dent Res* 88, 1113-1118.
- Jiao**, W., Miyazaki, K., Kitajima, Y., 2002. Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *British journal of cancer* 86, 98-101.
- Johnson**, N., 2001. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 65, 328-339.
- Jordan**, R.C., Macabeo-Ong, M., Shiboski, C.H., Dekker, N., Ginzinger, D.G., Wong, D.T., Schmidt, B.L., 2004. Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6460-6465.
- Kalluri**, R., 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 119, 1417-1419.
- Kalluri**, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- Katayama**, A., Bando, N., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T., Nonaka, S., Harabuchi, Y., 2004. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res* 10, 634-640.
- Kim**, H.K., Zhang, H., Li, H., Wu, T.T., Swisher, S., He, D., Wu, L., Xu, J., Elmets, C.A., Athar, M., Xu, X.C., Xu, H., 2008. Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 10, 1411-1420.
- Kirfel**, J., Magin, T.M., Reichelt, J., 2003. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci* 60, 56-71.
- Kramer**, I.R., Lucas, R.B., Pindborg, J.J., Sobin, L.H., 1978. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46, 518-539.
- Kreimer**, A.R., Villa, A., Nyitray, A.G., Abrahamsen, M., Papenfuss, M., Smith, D., Hildesheim, A., Villa, L.L., Lazcano-Ponce, E., Giuliano, A.R., 2011. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, 172-182.
- Landis**, S.H., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A., 1999. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 49, 8-31, 31.

- Leckband**, D., Prakasam, A., 2006. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* 8, 259-287.
- Lee**, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E.W., 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973-981.
- Liu**, D., Hou, J., Hu, X., Wang, X., Xiao, Y., Mou, Y., De Leon, H., 2006. Neuronal chemorepellent Slit2 inhibits vascular smooth muscle cell migration by suppressing small GTPase Rac1 activation. *Circ Res* 98, 480-489.
- Liu**, J., Wu, X., Mitchell, B., Kintner, C., Ding, S., Schultz, P.G., 2005. A small-molecule agonist of the Wnt signaling pathway. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 1987-1990.
- Lo Muzio**, L., Campisi, G., Farina, A., Rubini, C., Pannone, G., Serpico, R., Laino, G., De Lillo, A., Carinci, F., 2005. P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 5, 63.
- Lo Muzio**, L., Pannone, G., Mignogna, M.D., Staibano, S., Mariggio, M.A., Rubini, C., Procaccini, M., Dolci, M., Bufo, P., De Rosa, G., Piattelli, A., 2004. P-cadherin expression predicts clinical outcome in oral squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol* 19, 1089-1099.
- Lopez**, R.G., Garcia-Silva, S., Moore, S.J., Bereshchenko, O., Martinez-Cruz, A.B., Ermakova, O., Kurz, E., Paramio, J.M., Nerlov, C., 2009. C/EBPalpha and beta couple interfollicular keratinocyte proliferation arrest to commitment and terminal differentiation. *Nat Cell Biol* 11, 1181-1190.
- Lubbe**, J., Nakazawa, H., Burg, G., 1997. [Telomerase]. *Hautarzt* 48, 615-621.
- Lyons**, J.G., Patel, V., Roue, N.C., Fok, S.Y., Soon, L.L., Halliday, G.M., Gutkind, J.S., 2008. Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. *Cancer Res* 68, 4525-4530.
- Maretzky**, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., Saftig, P., 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9182-9187.
- Marur**, S., D'Souza, G., Westra, W.H., Forastiere, A.A., 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11, 781-789.
- Marur**, S., Forastiere, A.A., 2008. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 83, 489-501.
- Maytin**, E.V., Lin, J.C., Krishnamurthy, R., Batchvarova, N., Ron, D., Mitchell, P.J., Habener, J.F., 1999. Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2. *Dev Biol* 216, 164-181.
- McCaul**, J.A., Gordon, K.E., Clark, L.J., Parkinson, E.K., 2002. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *Lancet Oncol* 3, 280-288.
- McGuire**, J.K., Li, Q., Parks, W.C., 2003. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol* 162, 1831-1843.
- Meijer**, L., Skaltsounis, A.L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X.P., Vonica, C.A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone,

- C., Musacchio, A., Roe, S.M., Pearl, L., Greengard, P., 2003. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* 10, 1255-1266.
- Mertsch**, S., Schmitz, N., Jeibmann, A., Geng, J.G., Paulus, W., Senner, V., 2008. Slit2 involvement in glioma cell migration is mediated by Robo1 receptor. *J Neurooncol* 87, 1-7.
- Meurman**, J.H., Uttamo, J., 2008. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontol Scand* 66, 321-326.
- Miyoshi**, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y., Miyazaki, K., 2004. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *British journal of cancer* 90, 1265-1273.
- Munoz-Guerra**, M.F., Marazuela, E.G., Fernandez-Contreras, M.E., Gamallo, C., 2005. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an indicator of poor prognosis. *Cancer* 103, 960-969.
- Najy**, A.J., Day, K.C., Day, M.L., 2008. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem* 283, 18393-18401.
- Nelson**, W.J., Nusse, R., 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Nieto**, M.A., 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166.
- Plotnikov**, A., Li, Y., Tran, T.H., Tang, W., Palazzo, J.P., Rui, H., Fuchs, S.Y., 2008. Oncogene-mediated inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta impairs degradation of prolactin receptor. *Cancer Res* 68, 1354-1361.
- Pokutta**, S., Weis, W.I., 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 237-261.
- Prasad**, A., Fernandis, A.Z., Rao, Y., Ganju, R.K., 2004. Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279, 9115-9124.
- Prasad**, A., Paruchuri, V., Preet, A., Latif, F., Ganju, R.K., 2008. Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 26624-26633.
- Prasad**, A., Qamri, Z., Wu, J., Ganju, R.K., 2007. Slit-2/Robo-1 modulates the CXCL12/CXCR4-induced chemotaxis of T cells. *J Leukoc Biol* 82, 465-476.
- Presland**, R.B., Dale, B.A., 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 383-408.
- Presland**, R.B., Jurevic, R.J., 2002. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ* 66, 564-574.
- Qian**, X., Karpova, T., Sheppard, A.M., McNally, J., Lowy, D.R., 2004. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 23, 1739-1748.
- Radice**, G.L., Ferreira-Cornwell, M.C., Robinson, S.D., Rayburn, H., Chodosh, L.A., Takeichi, M., Hynes, R.O., 1997. Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* 139, 1025-1032.

- Rhee**, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J., Balsamo, J., 2007. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* 9, 883-892.
- Rhee**, J., Mahfooz, N.S., Arregui, C., Lilien, J., Balsamo, J., VanBerkum, M.F., 2002. Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol* 4, 798-805.
- Sabatier**, C., Plump, A.S., Le, M., Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y., Tessier-Lavigne, M., 2004. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117, 157-169.
- Saito**, T., Oda, Y., Kawaguchi, K., Sugimachi, K., Yamamoto, H., Tateishi, N., Tanaka, K., Matsuda, S., Iwamoto, Y., Ladanyi, M., Tsuneyoshi, M., 2004. E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* 23, 8629-8638.
- Santiago-Martinez**, E., Soplop, N.H., Patel, R., Kramer, S.G., 2008. Repulsion by Slit and Roundabout prevents Shotgun/E-cadherin-mediated cell adhesion during Drosophila heart tube lumen formation. *J Cell Biol* 182, 241-248.
- Schenk**, P., 1975. [Melanocytes, Langerhans and Merkel cells in oral epithelium]. *Acta Otolaryngol* 80, 301-311.
- Schlessinger**, K., Hall, A., 2004. GSK-3beta sets Snail's pace. *Nat Cell Biol* 6, 913-915.
- Scully**, C., Field, J.K., Tanzawa, H., 2000. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 36, 256-263.
- Shapiro**, L., Weis, W.I., 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003053.
- Sheth**, P., Seth, A., Atkinson, K.J., Gheyi, T., Kale, G., Giorgianni, F., Desiderio, D.M., Li, C., Naren, A., Rao, R., 2007. Acetaldehyde dissociates the PTP1B-E-cadherin-beta-catenin complex in Caco-2 cell monolayers by a phosphorylation-dependent mechanism. *Biochem J* 402, 291-300.
- Shiau**, C.E., Bronner-Fraser, M., 2009. N-cadherin acts in concert with Slit1-Robo2 signaling in regulating aggregation of placode-derived cranial sensory neurons. *Development* 136, 4155-4164.
- Simpson**, J.H., Kidd, T., Bland, K.S., Goodman, C.S., 2000. Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28, 753-766.
- Sogabe**, Y., Suzuki, H., Toyota, M., Ogi, K., Imai, T., Nojima, M., Sasaki, Y., Hiratsuka, H., Tokino, T., 2008. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 32, 1253-1261.
- Sou**, P.W., Delic, N.C., Halliday, G.M., Lyons, J.G., 2010. Snail transcription factors in keratinocytes: Enough to make your skin crawl. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1940-1944.



- Stambolic, V.,** Woodgett, J.R., 1994. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303 ( Pt 3), 701-704.
- Sun, L.,** Diamond, M.E., Ottaviano, A.J., Joseph, M.J., Ananthanarayan, V., Munshi, H.G., 2008. Transforming growth factor-beta 1 promotes matrix metalloproteinase-9-mediated oral cancer invasion through snail expression. *Mol Cancer Res* 6, 10-20.
- Syrigos, K.N.,** Karachalios, D., Karapanagiotou, E.M., Nutting, C.M., Manolopoulos, L., Harrington, K.J., 2009. Head and neck cancer in the elderly: an overview on the treatment modalities. *Cancer Treat Rev* 35, 237-245.
- Syrjanen, S.,** 2005. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S59-66.
- Takeno, S.,** Noguchi, T., Fumoto, S., Kimura, Y., Shibata, T., Kawahara, K., 2004. E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications. *Am J Clin Pathol* 122, 78-84.
- Takkunen, M.,** Grenman, R., Hukkanen, M., Korhonen, M., Garcia de Herreros, A., Virtanen, I., 2006. Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 54, 1263-1275.
- Ten Cate, A.R.,** 1998. *Oral Histology. Development, Structure, and Function*, 5th Edition ed. Mosby, St. Louis.
- Tseng, R.C.,** Lee, S.H., Hsu, H.S., Chen, B.H., Tsai, W.C., Tzao, C., Wang, Y.C., 2010. SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates beta-catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis. *Cancer Res* 70, 543-551.
- Turley, E.A.,** Veiseh, M., Radisky, D.C., Bissell, M.J., 2008. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol* 5, 280-290.
- Wang, B.,** Xiao, Y., Ding, B.B., Zhang, N., Yuan, X., Gui, L., Qian, K.X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., Geng, J.G., 2003. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4, 19-29.
- Wang, J.,** Wang, X., Gong, W., Mi, B., Liu, S., Jiang, B., 2009. Increased expression of beta-catenin, phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta, cyclin D1, and c-myc in laterally spreading colorectal tumors. *J Histochem Cytochem* 57, 363-371.
- Werbowsky-Ogilvie, T.E.,** Seyed Sadr, M., Jabado, N., Angers-Loustau, A., Agar, N.Y., Wu, J., Bjerkvig, R., Antel, J.P., Faury, D., Rao, Y., Del Maestro, R.F., 2006. Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit. *Oncogene* 25, 5103-5112.
- Wheelock, M.J.,** Johnson, K.R., 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 15, 509-514.
- Williams, H.K.,** Sanders, D.S., Jankowski, J.A., Landini, G., Brown, A.M., 1998. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 27, 308-317.
- Wu, J.Y.,** Feng, L., Park, H.T., Havlioglu, N., Wen, L., Tang, H., Bacon, K.B., Jiang, Z., Zhang, X., Rao, Y., 2001. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* 410, 948-952.

- Yiin**, J.J., Hu, B., Jarzynka, M.J., Feng, H., Liu, K.W., Wu, J.Y., Ma, H.I., Cheng, S.Y., 2009. Slit2 inhibits glioma cell invasion in the brain by suppression of Cdc42 activity. *Neuro Oncol* 11, 779-789.
- Yokoyama**, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H., Nagayama, M., 2003. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 22, 891-898.
- Yokoyama**, K., Kamata, N., Hayashi, E., Hoteiya, T., Ueda, N., Fujimoto, R., Nagayama, M., 2001. Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* 37, 65-71.
- Yook**, J.I., Li, X.Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Choi, Y.J., Kim, J., Fearon, E.R., Weiss, S.J., 2006. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol* 8, 1398-1406.
- Ypsilanti**, A.R., Zagar, Y., Chedotal, A., 2010. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137, 1939-1952.
- Yuspa**, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M., Roop, D.R., 1989. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* 109, 1207-1217.
- Zain**, R.B., 2001. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer--a brief overview. *Oral Oncol* 37, 205-210.
- Zhang**, W.M., Lo Muzio, L., Rubini, C., Yan, G., 2005. Effect of WNT-1 on beta-catenin expression and its relation to Ki-67 and tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 13, 1095-1099.
- Zhou**, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., Hung, M.C., 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6, 931-940.
- Zhu**, A.J., Watt, F.M., 1996. Expression of a dominant negative cadherin mutant inhibits proliferation and stimulates terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Journal of cell science* 109 ( Pt 13), 3013-3023.
- Zhu**, S., Oh, H.S., Shim, M., Sterneck, E., Johnson, P.F., Smart, R.C., 1999. C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19, 7181-7190.
- Zygogianni**, A.G., Kyrgias, G., Karakitsos, P., Psyrris, A., Kouvaris, J., Kelekis, N., Kouloulis, V., 2011. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. *Head Neck Oncol* 3, 2.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abl	Abelson
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxidsulfat
arm	Armadillo
as-Pcad	antisense-P-cadherin
as-Snail	antisense-Snail
BCA	bicinchoninic acid
BIO	6-bromoindirubin-3'-oxime
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
cDNA	copy DNA
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
Dsh	Dishevelled
EC	extrazelluläre Cadherin-Domäne
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	endosomales Recycling-Kompartiment
FACS	fluorescence activated cell sorting
fb-Pcad	function-blocking-P-cadherin
FKS	fötales Kälberserum
Frz	Frizzled
gDNA	genomische DNA
GSK3-beta	Glycogen-Synthase-Kinase-3-beta
HAV	Histidin-Alanin-Valin
HOK	humane, orale Keratinozyten
HPV	humane Papillomviren
IC	Immunzytochemie
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin gamma
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation

K	Keratin
kDa	kilo Dalton
Lef	lymphoid enhancer factor
LiCl	Lithiumchlorid
LRR	leucin-rich repeats
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSP	methylierungsspezifische PCR
OSCC	oral squamous cell carcinoma
p120	p120-Catenin
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS mit 0,1% Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLA	proximity ligation assay
POK	primäre, orale Keratinozyten
pRb	Retinoblastom-Protein
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
rm	recombinant mouse
RNA	ribonucleic acid
Robo	Roundabout
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
scr siRNA	scrambled siRNA
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SSC	saline sodium citrat
βTrCP	β-transducin repeat-containing protein
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamin
Tcf	T cell factor
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
WB	Western Blot
Wnt	Wingless and Int-1
ZNS	zentrales Nervensystem

## Antikörperliste

Antigen	Spezies (Hersteller)	Verwendung
Abl	Maus, monoklonal (BD Pharmingen)	PLA: 1:50 1h 37°C
beta-Aktin	Kaninchen, monoklonal (Abcam, Cambridge, UK)	WB: 1:10.000 16 h 4°C
beta-Catenin	Maus, monoklonal (BD Transduction Laboratories)	IF: 1:100 1 h 37°C WB: 1:1.000 16 h 4°C
C/EBP-beta	Kaninchen, monoklonal (Abcam)	IF: 1:100 16 h 4°C WB: 1:1.000 16 h 4°C
E-Cadherin	Maus, monoklonal (BD Transduction Laboratories)	WB: 1:5.000 16 h 4°C
Function blocking Cadherin P (N-terminal)	Maus, monoklonal (Thermo Scientific)	1:10 16 h 37°C
GSK3-beta (C-terminal)	Maus, monoklonal (Abcam)	PLA: 1:50 1h 37°C
GSK3-beta (N-terminal)	Kaninchen, monoklonal (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)	WB: 1:1.000 16 h 4°C
IgG Kontroll- Antikörper	Maus, monoklonal (Abcam)	1:10 16 h 37°C
Keratin-1	Maus, monoklonal (GenScript, Piscataway, USA)	WB: 1:2.000 16 h 4°C
Keratin-10	Kaninchen, monoklonal (Epitomics, Burlingame, USA)	WB: 1:1.000 16 h 4°C
N-Cadherin	Maus, monoklonal (BD Transduction Laboratories)	WB: 1:5.000 16 h 4°C
P-Cadherin (C-terminal)	Kaninchen, polyklonal (Abnova, Heidelberg, Deutschland)	PLA: 1:50 1 h 37°C
P-Cadherin (N-terminal)	Maus, monoklonal (BD Transduction Laboratories)	IC: 1:100 1 h RT IF: 1:100 1h 37°C IHC: 1:100 1 h RT WB: 1:1.000 16 h 4°C
Phospho-beta- Catenin	Kaninchen, monoklonal (Cell Signaling Technology)	WB: 1:1.000 16 h 4°C
Phospho-GSK3-beta (Serin-9)	Kaninchen, monoklonal (Cell Signaling Technology)	WB: 1:1.000 16 h 4°C
Robo-3 (C-terminal)	Ziege, polyklonal (antibodies-online GmbH, Aachen, Deutschland)	IHC: 1:5 16 h 4°C IP: 4 µg PLA: 1:50 1 h 37°C WB: 1:1.000 16 h 4°C
Slit-2	Ziege, polyklonal	IHC: 1:5 16 h 4°C

	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)	WB: 1:500 16 h 4°C
Snail	Kaninchen, polyklonal (Abcam)	IC: 1:100 1 h 37°C
		IHC: 1:100 1 h 37°C
		IP: 1:100 4 h 4°C
		PLA: 1:50 1h 37°C
		WB: 1:1.000 16 h 4°C

**Tabelle 16**  
**Liste der verwendeten Primärantikörper**

<b>Sekundärantikörper (Hersteller)</b>	<b>Verwendung</b>
Alexa 488 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	IF: 1:500 1 h 37°C
Esel-anti-Ziege IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)	IHC: 1:400 1 h 37°C
	WB: 1:4.000 1 h RT
Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP (Pierce, Bonn, Deutschland)	WB: 1:3.000 1 h RT
Ziege-anti-Maus IgG-HRP (Thermo Scientific)	WB: 1:1.000 1 h RT

**Tabelle 17**  
**Liste der verwendeten Sekundärantikörper**

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung und ihre Motivation zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Torsten Reichert, der mir als Direktor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Institut meine Dissertation zu erstellen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Ernst Tamm bedanken, der freundlicherweise die Betreuung dieser Arbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Regensburg übernommen hat.

Zu großem Dank bin ich Frau Prof. Anja Bosserhoff verpflichtet. Ihre anregenden Ideen sowie ihre wissenschaftliche Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Richard Bauer für seine außergewöhnlich gute und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Seine unermüdliche Unterstützung, Motivation und Diskussionsbereitschaft sowie seine unzähligen spontanen Ideen haben maßgeblich zur erfolgreichen Durchführung der Experimente und somit zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Aufrichtig möchte ich mich bei Herrn Dr. Albert Dowejko und Frau Brigitta Hauer für ihre zahlreichen hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge sowie für die unbeschreiblich gute Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums für medizinische Biotechnologie für die geleistete Hilfsbereitschaft, technische Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Unter diesen Bedingungen war es mir immer eine große Freude, hier zu arbeiten.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Karin Bauer, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ort, Datum

Karin Bauer